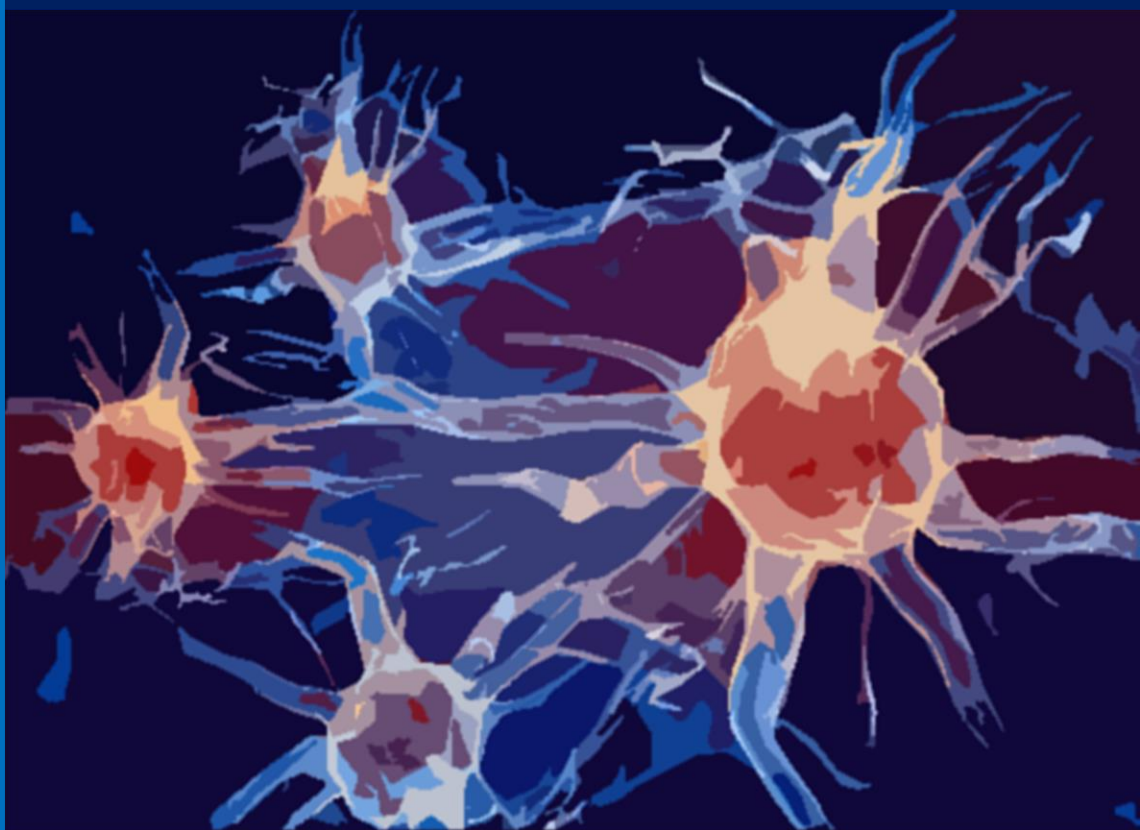


**PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN LA RESPUESTA  
INMUNE Y EN LA PÉRDIDA NEURONAL  
ASOCIADA A UN MODELO MURINO DE  
DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO**

**Alejandro Carrillo Jiménez**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA (IBIS)**



# TESIS DOCTORAL




Sevilla 2018

El Dr. José Luis Venero Recio, Catedrático de Universidad asociado a la Universidad de Sevilla,  
y el Dr. Miguel Ángel Burguillos García, Investigador asociado a la Universidad de Cambridge

**INFORMAN:**

Que D. Alejandro Carrillo Jiménez ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral titulada  
**PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LA PÉRDIDA NEURONAL ASOCIADA A UN MODELO MURINO DE DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO.** Considerando que constituye el trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla  
a 15 de mayo de 2018.



**Fdo. Dr. José Luis Venero Recio**



**Fdo. Dr. Miguel Ángel Burguillos García**







Dr. José Luis Venero Recio, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla.

**INFORMAN:**

Que D. Alejandro Carrillo Jiménez ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral bajo la dirección del Dr. José Luis Venero Recio y el Dr. Miguel Ángel Burguillos García.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Sevilla a 15 de mayo de 2018.

**Fdo. Dr. José Luis Venero Recio**



La mayoría de los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido publicados en la revista *Scientific Reports* en 2017 con el nombre de «*Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration*».



**PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN LA RESPUESTA INMUNE Y  
EN LA PÉRDIDA NEURONAL ASOCIADA A UN MODELO  
MURINO DE DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO**

Memoria presentada por el Ldo. Alejandro Carrillo Jiménez para optar al  
grado de doctor por la Universidad de Sevilla



# AGRADECIMIENTOS

Me pregunto de qué sirve el apartado de los agradecimientos puestos sobre un papel, ¿no es más importante agradecer y cuidar a la gente de la que se rodea uno? Yo por mi parte espero haber sabido transmitir, con palabras o gestos, el cariño y el agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí. De todas formas, plasmar en papel mis agradecimientos puede tener una utilidad para que los lectores sepan de dónde viene mi tesis y con qué clase de personas me he relacionado y apoyado para poder llegar hasta aquí.

A mi director, el Dr. José Luis Venero Recio, decir que para mí y creo que para todos nosotros es **Jose**, un director, un jefe, un referente y un compañero. Es una persona que exige a la misma vez que motiva, que nos propone retos y nos hace creer que somos capaces de llevarlos a cabo, llevándonos al límite intentando que nos superemos a nosotros mismos. Me ha relacionado con personas que nunca imaginé que trabajaría y que me ha brindado la oportunidad de adquirir un amplio abanico de cualidades y conocimientos. Estaré siempre agradecido.

Como colaboración más importante a título personal, ya que fue en la que más involucrado estuve, fue la que realicé con mi co-director el **Dr. Miguel Ángel Burguillos García** (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK) y el **Dr. Ping Kei Yip** (Queen Mary, University of London, UK). Esta colaboración me abrió las puertas a futuras y fructíferas colaboraciones con Miguel, creando una estrecha relación con él. Gracias a esto pude conocer al **Dr. Guy Charles Brown** (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK) con el que tuve la gran suerte de realizar una de mis dos estancias durante el doctorado. Tanto al Dr. Miguel Ángel Burguillos como al Dr. Guy C. Brown tengo que agradecerles personalmente la gran acogida que tuve en Cambridge, y en especial a todo su grupo (**David, Tom, Michiko, Ana Vilalta y Mar Puigdemalliv**), de quienes aprendí mucho a nivel científico y personal.

La primera estancia que realicé en el extranjero fue con el grupo del **Dr. Tomas Deierborg** (BMC, University of Lund, Suecia). Esta era la primera vez que trabajaba en el

extranjero, con las dificultades y estrés que conlleva estar lejos de casa y hablar en otro idioma diferente al nativo. He de decir que tanto Tomas como su grupo (**Antonio Boza, Yiyi Yang y Martina**) convirtieron mi estancia allí en uno de los mejores veranos de mi vida. Durante esta estancia, aprendí técnicas y formas de trabajar nuevas que fueron cruciales para mi aprendizaje y el posterior desarrollo de mi tesis doctoral.

Muy importante ha sido para mi formación como investigador la colaboración con el grupo del **Dr. Bertrand Joseph** (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia). Gracias a mi director de tesis José Luis me puse en contacto con el grupo de Estocolmo y llevé a cabo uno de los experimentos que han significado uno de los mayores retos durante mi doctorado y que tuvo como fruto mi más importante artículo como colaborador.

Pero son las personas con las que trabajas y convives cada día las que te ayudan y te dan fuerzas para llevar a cabo los grandes retos que se te plantean a lo largo de toda tu vida investigadora. Por ello les debo mucho a todas las personas que forman y que han formado mi grupo (**Jose Luis, Martiniano, Antonio, Rocío, Ana, Rocío Ruiz, José Antonio, Khadija, Manolo, María José, Mario, Elena, Paco, Juan Carlos, Eloisa, Juan, Irene y Marian**). Quiero comentar, especialmente, que no acabé trabajando en mi departamento de casualidad, los responsables de ello han sido **Rocío, Jose y Marti**. Ellos fueron mis profesores y fue su forma de impartir docencia la que me hizo interesarme por la bioquímica y me llevó, finalmente, a interesarme por la investigación. Agradezco también, la disponibilidad de **Rocío y Ana**, profesoras y posteriormente compañeras, a escucharme y ayudarme en los problemas propios de un becario predoctoral. A **Antonio** le tengo que dar las gracias por el tiempo y el interés mostrado en cualquier duda que nos surgiera por muy enrevesada que fuera; de hecho, cuanto peor, mejor para él. Además de dedicarse a activarnos nuestras mentes atrofiadas por el trabajo rutinario y el estrés, con acertijos y problemas de lógica. A **Rocío Ruiz** que es un caso aparte literalmente. Llegó la última y en tres años se ha convertido en un pilar necesario para todos. Es la compañera perfecta, exigente, pero a la vez da confianza y apoyo a sus compañeros.



Los directores de tesis y los padres son los mayores responsables de que uno haya podido llegar hasta este momento, o por lo menos eso se suele decir. Sin embargo, yo no puedo dejar de pensar en que estos cuatro años de tesis doctoral hubieran sido muy diferentes sin mis compañeros **Juan, Irene y Marian**. Me ha encantado trabajar junto a ellos y creo que somos un grupo (en el que incluyo a Rocío Ruiz) que podríamos hacer todo lo que nos propusiéramos. Nos hemos divertido trabajando y nos hemos apoyado y ayudado en los momentos difíciles porque, ante todo, somos amigos. Y no me quiero olvidar de los compañeros y amigos que ya se fueron del laboratorio como son **María José y Mario**. He aprendido muchísimo de ellos y me han facilitado mucho el camino.

Un apartado especial para **Carmen**, ya que yo también me he sentido tratado por ella de forma especial. Destaco su ayuda y disposición para resolver cualquier tipo de problema como si fuera suyo.

También quiero mencionar a toda la gente externa a mi grupo con la que he colaborado. Mi agradecimiento al grupo del IBIS del **Dr. Javier Vitorica**, a su plena disponibilidad para ofrecer su ayuda y consejo, especialmente **Seba y Victoria**. Mencionar la labor de **María José Castro** como técnico del área de citometría del IBIS, una persona muy profesional y agradable con la que siempre es un gusto trabajar. Lo mismo ocurre con el personal del CITIUS I y II (**Juan Luis Rivas, Modesto Caraballo, Laura Navarro y Cristina Reyes**), profesionales que te hacen el trabajo mucho más fácil.

Y, finalmente, la **familia y los amigos**. Evidentemente la implicación de mis compañeros de laboratorio o colaboradores en mi tesis doctoral no tiene nada que ver con la que mis familiares y amigos hayan podido tener, pero aun no teniendo una implicación directa, no quiere decir que haya sido menos importante.

Para poder llevar a cabo grandes esfuerzos en tu vida laboral debes tener detrás una vida y apoyo personal enorme. Este es mi caso. Tengo los mejores **amigos** que se puede tener, y a **Gloria**, mi compañera en la vida y la persona más maravillosa del mundo, que me hace sentirme feliz y capaz de conseguir cualquier cosa, restándole importancia a lo que no la tiene y haciéndome afrontar los verdaderos problemas con filosofía y templanza.

Tengo una **familia** que me admira y se alegra de todos mis logros y son ellos mismos los que me hacen tener la determinación necesaria para conseguir todo lo que me proponga. **Mi abuela** es un claro ejemplo de determinación y una de las personas que más alegría me da poder regalarle este momento. A mi **hermano Samuel** tengo que agradecerle que siempre haya cuidado de mí, como hermano mayor que yo, que lo es. A su lado siempre me he sentido seguro de mí mismo.

Por último, dedicarles a **mis padres** todo lo que he conseguido hasta ahora. Ellos conocen lo mejor y lo peor de mí, mis debilidades y fortalezas, y me dan el cariño y la seguridad necesaria para poder llegar hasta donde yo quiera. Todo lo que soy y pueda llegar a ser se lo debo a ellos.

# ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ACV</b>	Accidente cerebrovascular
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>Akt</b>	<i>Protein kinase B (PKB)</i>
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E
<b>ARG1</b>	Arginasa-1
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>Axl</b>	<i>Tyrosine-protein kinase receptor UFO</i>
<b>Aβ</b>	Amiloide beta
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CA1</b>	Cornu Ammonis 1
<b>CD14</b>	<i>Cluster of differentiation 14</i>
<b>CD200</b>	<i>OX2 membrane glycoprotein ligand</i>
<b>CD200R</b>	<i>OX2 membrane glycoprotein receptor</i>
<b>CD36</b>	<i>Cluster of differentiation 36 or Glicoproteína plaquetaria 4</i>
<b>CD47</b>	<i>Cluster of differentiation 47 or Integrin associated protein (IAP)</i>
<b>Clec7a</b>	C-type lectin domain family 7 member A or Dectin-1
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>CSF1R</b>	<i>Colony-stimulating factor 1 receptor</i>
<b>CtsD</b>	Catepsina D
<b>CX3CL1</b>	<i>CX3C chemokine ligand 1 or fractalkine</i>
<b>CXCL10</b>	<i>CXC chemokine 10</i>
<b>CX3CR1</b>	<i>CX3C chemokine receptor 1 or fractalkine receptor</i>
<b>DAB</b>	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>

<b>DAM</b>	<i>Disease-associated microglia</i>
<b>DAMPs</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>DG</b>	Giro dentado
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DRC</b>	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
<b>DRG</b>	<i>Dorsal root ganglion</i>
<b>DSS</b>	Dextrán sulfato sódico
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EAE</b>	Encefalomielitis Autoinmune Experimental
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>GCS</b>	<i>Glasgow Coma Scale</i>
<b>GD</b>	Giro Dentado
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>HMGB1</b>	<i>High mobility group box 1</i>
<b>IGFR1</b>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i>
<b>HEPES</b>	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
<b>Hexb</b>	Hexosaminidasa B
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
<b>IB</b>	<i>Immunoblotting</i>
<b>Iba1</b>	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
<b>ICC</b>	Impacto cortical controlado
<b>i.c.</b>	Intracraneal
<b>IDE</b>	Insulin-degrading enzyme
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia

<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón-gamma.
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>ILK</b>	<i>Integrin-linked kinase</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthases</i>
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ItgAX</b>	<i>Integrin alpha X or CD11c</i>
<b>KO</b>	<i>Knock out</i>
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MafB</b>	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
<b>MCSFR</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
<b>MerTK</b>	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER</i>
<b>Mgat5</b>	N-acetilglucosaminiltransferasa 5
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>NADPHox</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase</i>
<b>NAMPs</b>	<i>Neurodegeneration-associated molecular pattern</i>
<b>NeuN</b>	<i>Neuronal nuclei</i>
<b>NF-kB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NLRP3</b>	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS2</b>	<i>Nitric oxide synthases 2</i>
<b>DAMPs</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer solution</i>

<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PRRs</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>P/S</b>	Penicilina/estreptomicina
<b>P2RY12</b>	<i>Purinergic receptor P2Y12</i>
<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RT-PCR</b>	<i>Real time PCR</i>
<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutasa 1
<b>TAE</b>	<i>Tris base/acetic acid/EDTA</i>
<b>TAMRA</b>	<i>Tetramethylrhodamine</i>
<b>TBI</b>	<i>Traumatic brain injury</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptors</i>
<b>TDG</b>	Tiodigalactósido
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TGS</b>	<i>Tris Base/Glycine/SDS</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TMEM119</b>	Proteína transmembrana 119
<b>TNFα</b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TREM2</b>	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
<b>TrkB</b>	Tropomyosin receptor kinase B
<b>TYROBP</b>	<i>TYRO protein tyrosine kinase-binding protein</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

# ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT .....	1
INTRODUCCIÓN .....	7
1. LA MICROGLÍA .....	9
1.1. ORIGEN .....	9
1.2. FUNCIONES .....	10
1.2.1. HOMEOSTASIS DEL SNC .....	10
1.2.2. INMUNIDAD INNATA DEL SNC .....	12
1.3. ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y NEUROINFLAMACIÓN .....	14
1.4. MICROGLÍA ASOCIADA A NEURODEGENERACIÓN .....	18
2. LAS GALECTINAS .....	22
2.1. TIPOS .....	22
2.2. FUNCIONES .....	24
2.3. FUNCIONES DE LA GALECTINA-3 .....	25
2.4. LA GALECTINA-3 EN LA RESPUESTA INMUNE EN EL SNC .....	29
2.5. LA GALECTINA-3 EN LA REMODELACIÓN TISULAR EN EL SNC .....	33
2.6. MODULADORES DE LA GALECTINA-3 .....	35
3. DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO (TBI) .....	36
3.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A TBI .....	37
3.2. IMPLICACIÓN POTENCIAL DE LA GALECTINA-3 EN TBI .....	39
OBJETIVOS/AIMS .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
1. CULTIVOS CELULARES .....	49
1.1. CULTIVO DE LÍNEA CELULAR .....	49
1.2. CULTIVO PRIMARIO DE CEREBRO .....	49
1.2.1. CULTIVO PRIMARIO DE MICROGLIA .....	50
1.2.2. CULTIVO PRIMARIO MIXTO GLIAL .....	51
1.3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR .....	52
1.4. PREPARACIÓN DE RESTOS NEURONALES Y SU MARCAJE .....	53
1.5. ENSAYO DE FAGOCITOSIS .....	53
1.6. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	54
2. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL .....	55
2.1. IMPACTO CORTICAL CONTROLADO .....	55
2.2. ADMINISTRACIÓN INTRACRANEAL .....	56
2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PERFUSIÓN INTRACARDIACA .....	57
3. GENOTIPADO .....	59
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN .....	59
3.2. PCR CONVENCIONAL. ANÁLISIS DEL ADN .....	59
4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO (ARNm) .....	61
4.1. EXTRACCIÓN DE ARN .....	61
4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN .....	62
4.3. PCR A TIEMPO REAL. ANÁLISIS DEL ARNm .....	62
5. ELISA .....	64
6. INMUNOPRECIPITACIÓN (IP) .....	65
7. INMUNOBLOTTING (IB) .....	66

8. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) .....	68
8.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	68
8.2. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	68
8.3. INMUNOFLOURESCENCIA .....	69
8.4. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA .....	70
9. TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA .....	71
9.1. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN DE LA TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA .....	72
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	72
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
1. LA GALECTINA-3 EN NUESTRO MODELO DE TBI .....	81
1.1. LA GALECTINA-3 SE INDUCE EN EL CEREBRO DE RATÓN DESPUÉS DEL TBI .....	81
1.2. LA GALECTINA-3 SE EXPRESA PREDOMINANTEMENTE EN CÉLULAS MICROGLIALES .....	83
1.3. LA GALECTINA-3 SE LIBERA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS DEL TBI .....	90
1.4. LA GALECTINA-3 SE UNE AL RECEPTOR TLR4 EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI .....	91
2. PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN NUESTRO MODELO DE TBI .....	92
2.1. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 PRODUCE NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI .....	92
2.2. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 DISMINUYE LA PRESENCIA DE CÉLULAS MICROGLIALES TRAS EL TBI .....	99
2.3. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 PRODUCE DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI .....	102
2.4. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR PRODUCE NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI .....	108
2.5. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR DISMINUYE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL TRAS EL TBI .....	112
2.6. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI .....	114
3. LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR AUMENTA LA PÉRDIDA NEURONAL POR FAGOCITOSIS MICROGLIAL <i>IN VITRO</i> .....	117
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
1. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE LA GALECTINA-3 EN EL CEREBRO DE RATÓN EN NUESTRO MODELO DE TBI .....	122
2. LA GALECTINA-3 COMO INMUNOMODULADOR EN EL TBI .....	124
2.1. LA GALECTINA-3 COMO INDUCTOR DE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL .....	124
2.2. LA GALECTINA-3 COMO INDUCTOR DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA .....	127
3. LA MODULACIÓN DE LA GALECTINA-3 COMO NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI .....	130
4. LA GALECTINA-3 COMO DIANA TERAPÉUTICA FRENTE AL TBI .....	132
<b>CONCLUSIONES/CONCLUDING REMARKS .....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>139</b>



# RESUMEN / ABSTRACT



La lesión cerebral traumática (TBI) es actualmente una causa importante de muerte y discapacidad en la sociedad occidental, con una estimación de 2,5 millones de personas afectadas cada año en Europa, lo que indica la necesidad de establecer nuevos avances orientados a su prevención y tratamiento. Dentro de las primeras 24 horas después del daño se desencadena una respuesta inflamatoria, aumentando la expresión de marcadores inflamatorios, incluyendo la lectina galectina-3 y, asociada a esta neuroinflamación, una pérdida neuronal.

En este proyecto de tesis hemos usado un modelo murino de TBI mediante un impacto cortical controlado para estudiar el papel de la galectina-3 en la regulación de la respuesta inmune y neurodegeneración asociada al TBI. Con objeto de dilucidar y distinguir el papel intracelular y extracelular de la galectina-3 utilizamos ratones transgénicos con ausencia total de la galectina-3 (ratones KOGal3) y ratones de fenotipo silvestre (ratones WT) a los que se trató con anticuerpos de neutralización contra galectina-3 (ratones Ac-Gal3) con objeto de inhibir selectivamente esta proteína a nivel extracelular.

Nuestro análisis muestra un aumento significativo en la expresión de la galectina-3 en el cerebro a las 24 horas después del impacto y en el lado ipsilateral al daño exclusivamente. En estas condiciones, el grupo celular responsable de esta expresión es la microglía reactiva, la cual se encuentra invadiendo la capa degenerada de células piramidales del hipocampo. Además, detectamos la liberación de la proteína galectina-3 al espacio extracelular y de ahí al líquido cefalorraquídeo, produciéndose también la unión de esta proteína liberada al receptor TLR4. Por otra parte, se observa a corto y largo plazo una pérdida neuronal producida por el TBI en la región ipsilateral de la corteza y el hipocampo, produciéndose, tanto con la ausencia total de la galectina-3

como con la neutralización, un efecto neuroprotector frente al daño neuronal. Además, los análisis realizados sobre la población microglial revelan que la neutralización de la galectina-3 disminuye la activación de estas células y la disminución de la expresión de los marcadores proinflamatorios (IL1 $\beta$ , IL6 y NOS2) inducidos en la región ipsilateral al daño tras el TBI. Por otro lado, la ausencia total de la galectina-3 aumenta la expresión de marcadores antiinflamatorios (ARG1 y Ym1) y la expresión de BDNF, también inducida en la región ipsilateral tras el TBI.

Por lo que la inducción de la liberación de la galectina-3 actúa como una señal de alarma en condiciones de TBI e induce una fuerte respuesta proinflamatoria y activación microglial, a través de la activación del receptor TLR4, la cual es responsable de la progresión de la neurodegeneración producida tras el daño inicial del TBI. Además, la galectina-3 extracelular podría interaccionar con el receptor MerTK actuando como opsonina y facilitando la fagocitosis de neuronas por parte de la microglía reactiva, contribuyendo de nuevo a la pérdida neuronal. Por otro lado, parece ser que la galectina-3 intracelular es la responsable de la regulación del estado antiinflamatorio y de la expresión de BDNF inducida por el TBI.

Por lo tanto, terapias dirigidas a modular la expresión o disponibilidad de la galectina-3 dentro de las primeras 24 horas después de la lesión podrían tener un efecto potencialmente positivo en los pacientes disminuyendo el avance y secuelas neuronales asociadas y desencadenadas por el daño inicial del TBI.

Traumatic brain injury (TBI) is currently a major cause of death and disability in western society, with an estimated 2.5 million people affected each year in Europe, indicating the need to establish new advances aimed at its prevention and treatment. Within the first 24 hours after the damage an inflammatory response is triggered increasing the expression of inflammatory markers, including the lectin galectin-3, and a neuronal loss is also associated with this neuroinflammation.

The aim of this thesis project is to study the role of galectin-3 in the regulation of the immune response and neurodegeneration associated with TBI, we have used a TBI model in mice by a controlled cortical impact. In order to elucidate and to distinguish between the intracellular and extracellular role of galectin-3 we used galectin-3 knock out transgenic mice (KOGal3 mice), with total absence of the galectin-3 protein, and wild type mice (WT mice) to which were treated with neutralizing antibodies against galectin-3 (Ac-Gal3 mice) in order to selectively inhibit this protein at the extracellular level.

Our results show a significant increase in the expression of galectin-3 in the brain at 24 hours after impact and on the ipsilateral side. Under these conditions, we find that the cellular group responsible for this expression is reactive microglia, which is invading the degenerated layer of pyramidal cells of the hippocampus. In addition, we detected galectin-3 protein release to the extracellular space and, and subsequently from there to the cerebrospinal fluid, producing the binding of this released protein to the TLR4 receptor. A short and long term neuronal loss was observed in the damaged ipsilateral area in the cortex and the hippocampus, producing a neuroprotective effect against the neuronal damage produced by the TBI both with the total absence of galectin-3 and with neutralization. In addition, the analyses performed on the microglial population reveal that the neutralization of galectin-3 decreases the activation of these cells and

furthermore, the expression of the proinflammatory markers (IL1 $\beta$ , IL6 and NOS2) induced in the damaged ipsilateral area. On the other hand, the total absence of galectin-3 increases the expression of antiinflammatory markers (ARG1 and Ym1) and the expression of BDNF, also induced in the ipsilateral area by TBI.

Thus, the induction of galectin-3 release acts as a warning signal in TBI conditions and induces a strong microglia activation and proinflammatory response, through the activation of the TLR4 receptor, which is responsible of the progression of neurodegeneration produced by the TBI-initial damage. In addition, extracellular galectin-3 could interact with the MerTK receptor acting as an opsonin and facilitating phagocytosis of neurons by mean of the reactive microglia, contributing again to neuronal loss. On the other hand, it seems that intracellular galectin-3 is responsible for the regulation of the antiinflammatory state and the expression of BDNF induced by the TBI.

Therefore, therapies focus on modulating the expression or availability of galectin-3 within the first 24 hours after the injury can have potentially a positive effect on TBI-patients by decreasing the advance of TBI-associated neuronal lost.

# INTRODUCCIÓN





## 1. LA MICROGLÍA

Las células de la microglía son los macrófagos tisulares del sistema nervioso central (SNC), con actividad fagocítica y de presentación de antígeno (CPA), siendo responsables de la respuesta inmune innata del SNC. Además, están implicadas en la homeostasis del cerebro, en los procesos de daño cerebral, en la respuesta neuroinflamatoria y en la neurodegeneración (Cartier *et al.*, 2014; Prinz *et al.*, 2014).

### 1.1. ORIGEN

A diferencia de la macroglía (astrocitos y oligodendrocitos) y las neuronas, que derivan del neuroectodermo, la microglía deriva del tejido mesodérmico periférico (Chan *et al.*, 2007; Prinz *et al.*, 2011) a partir de precursores que expresan el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSFR), también llamado receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R). Las células microgliales tienen su origen en precursores eritromieloides presentes en el saco vitelino durante la embriogénesis temprana, entre los días 8,5 y 9,5 después de la concepción (Schulz *et al.*, 2012), los cuales migran al mesodermo y de ahí al SNC en desarrollo, antes de que la barrera hematoencefálica (BHE) se cierre y restrinja la migración celular al cerebro (Alliot *et al.* 1999; Ginhoux *et al.*, 2010; Kierdorf *et al.*, 2013).

Estas células primitivas tienen la capacidad de dar lugar a microglía y a macrófagos. Durante su viaje al SNC en desarrollo, estos progenitores se someten a un proceso de desarrollo gradual sincronizado con el desarrollo cerebral. En este proceso adquieren marcadores específicos de macrófagos y finalmente se establecen en el tejido cerebral, donde se diferencian en células microgliales en un proceso de desarrollo extremadamente complejo y donde se requiere la presencia de moléculas específicas

en diferentes tiempos. Por ello, la microglía se podría describir como una población de macrófagos específicos del tejido cerebral que es claramente diferente genéticamente de las células mieloides circulantes (Kierdorf *et al.*, 2013).

Una vez finalizado el proceso de migración, desarrollo y diferenciación, la microglía adquiere un fenotipo estable y esencial para la protección y la homeostasis cerebral (Ginhoux *et al.*, 2015; Matcovitch-Natan *et al.*, 2016).

## **1.2. FUNCIONES**

Durante décadas, el cerebro ha sido visto como un órgano inmunoprivilegiado, donde la inflamación solo puede ocurrir a través de una infección interna y directa o después de la ruptura de la BHE y la posterior infiltración de células inmunitarias periféricas, ya sea debido a una inflamación periférica o por un traumatismo craneoencefálico. Ahora se sabe que las células microgliales actúan como sensores de daño en el SNC (Nimmerjahn *et al.*, 2005), reaccionando ante casi cualquier perturbación o estímulo que modifique la homeostasis cerebral, activándose y desencadenando la respuesta inmune en el cerebro (Kreutzberg, 1996).

### **1.2.1. HOMEOSTASIS DEL SNC**

Las células microgliales se encuentran diseminadas por el SNC, en estado de reposo. En condiciones fisiológicas la microglía realiza funciones de mantenimiento de la homeostasis tisular, la integridad neuronal y el funcionamiento de la red neuronal en el cerebro (Figura 1). Esta microglía homeostática se caracteriza por un gran número de procesos que se mueven constantemente y que facilitan la interacción de la microglía con los vasos sanguíneos vecinos, las neuronas y los astrocitos. Estas interacciones son

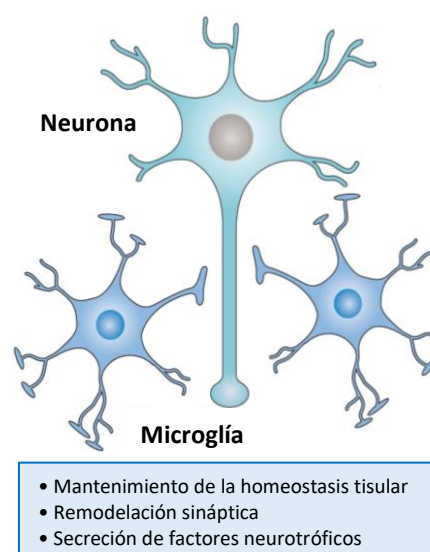
importantes para el mantenimiento del tejido cerebral y la plasticidad neuronal (Figura 1) (Wake *et al.*, 2009; Paolicelli *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2012; Parkhurst *et al.*, 2013).

La superficie de la célula microglial está equipada con numerosos transportadores, canales y receptores. Estos incluyen receptores para neurotransmisores, neurohormonas, neuromoduladores, citoquinas y quimioquinas, así como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).

Durante la sinaptogénesis embrionaria, la microglía ayuda a la formación de sinapsis entre las neuronas secretando hormonas de crecimiento y trombospondinas (Rigato *et al.*, 2011). La actividad sináptica también está influenciada por la microglía a través de la secreción de neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), crucial para la formación de sinapsis (Parkhurst *et al.*, 2013).

Es posible que otros productos secretados por la microglía contribuyan igualmente a la remodelación de sinapsis y a la modulación de la red neuronal, incluso pudiendo influir en la neurogénesis adulta en el cerebro (Vukovic *et al.*, 2012). Además, durante el estado adulto, la microglía utiliza sus procesos finos para explorar constantemente las sinapsis disfuncionales, que son capaces de eliminar por fagocitosis (Wake *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2010).

**Figura 1. Representación de la microglía homeostática.** En el cerebro sano, la microglía forma una red distribuida por todo el cerebro y en contacto muy estrecho con las dendritas y las sinapsis de las neuronas vecinas. La microglía remodela las sinapsis y secreta factores neurotróficos, como el BDNF, que mantienen una adecuada función de la red neuronal. La microglía también elimina la acumulación de desechos celulares, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis tisular. Adaptado de Heneka *et al.* *Nature Reviews Immunology* 2014.

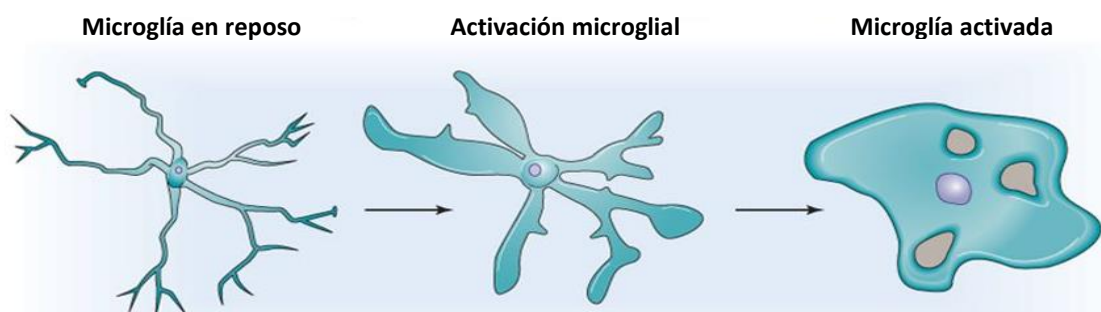


En el cerebro sano, la microglía se encuentran en un estado de reposo, tanto a nivel molecular como funcional, definido como estado homeostático único (M0) (Gautier *et al.*, 2012; Hickman *et al.*, 2013; Butovsky *et al.*, 2014). Esta actividad microglial está controlada por vías inhibitorias inmunes específicas que suprimen las respuestas inflamatorias no deseadas y la destrucción del tejido que a menudo se asocian con la activación inmune (Hanisch *et al.*, 2007). Estos mecanismos inhibitorios incluyen interacciones directas de la microglía con neuronas a través de los pares ligando-receptor entre la quimioquina CX3C1 o fractalquina y su receptor (CX3CL1-CX3CR1) y entre la glicoproteína de membrana OX2 y su receptor (CD200-CD200R) (Biber *et al.*, 2007), moléculas solubles presentes en el medio del SNC como el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) (Butovsky *et al.*, 2014; Gosselin *et al.*, 2014) y reguladores intracelulares tales como el factor de transcripción homólogo del oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico V-Maf (MafB) (Ransohoff *et al.*, 2010; Butovsky *et al.*, 2015; Lauro *et al.*, 2015; Matcovitch-Natan *et al.*, 2016).

### **1.2.2. INMUNIDAD INNATA DEL SNC**

En el caso de situaciones de alteración de la homeostasis cerebral por infección, traumatismo o neurodegeneración, la microglía residente está expuesta a niveles no fisiológicos de activadores inmunes, los cuales son detectados a través de sus PRRs, propiciando la activación microglial. La activación de la microglía está acompañada de alteraciones morfológicas graduales (Figura 2). La activación en la etapa inicial se caracteriza por una mayor ramificación de los procesos citoplasmáticos, el tamaño celular y la inducción en la expresión del marcador microglial Iba1. Después de eso, sigue un mayor engrosamiento de los procesos, la retracción de los más finos y el aumento

del tamaño del cuerpo celular. Por último, se produce una retracción completa de los procesos citoplasmáticos, adquiriendo así la morfología ameboide (Figura 2).



**Figura 2. Representación de los cambios morfológicos experimentados durante la activación microglial.** La microglía en reposo presenta ramificaciones finas y alargadas. Durante la activación se produce la retracción y engrosamiento de sus ramificaciones y soma. La microglía activada presenta morfología ameboide y con capacidad fagocítica.

Los activadores inmunes son moléculas con capacidad de activar a los receptores PRRs, entre los que se encuentran los receptores tipo "toll" (TLRs) TLR2, TLR4 y TLR6 (Chen *et al.*, 2010), pudiendo con ello desencadenar una respuesta inmune en el SNC (Hennessy *et al.*, 2010). Algunos ligandos de los TLRs también activan los co-receptores CD36, CD14 y CD47 o también llamado proteína asociada a integrina (IAP) (Jin *et al.*, 2008; Udan *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2010; Lamkanfi *et al.*, 2012; Fellner *et al.*, 2013; Latz *et al.*, 2013) y el receptor iniciador expresado en células mieloides 2 (TREM2) (Figura 3). Distinguimos inicialmente dos tipos de moléculas estimuladoras de PRRs. Por un lado, aquellas asociadas a agentes infecciosos y definidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y por otro, ligandos endógenos de PRRs provenientes de restos celulares derivados de células apoptóticas, neurodegeneradas o dañadas por un traumatismo, definidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Estos se pueden encontrar en cerebros de pacientes con alguna alteración, traumatismo o enfermedad neurodegenerativa en forma de proteínas mal plegadas, péptidos

agregados, ácidos nucleicos y restos neuronales (Heneka *et al.*, 2014). Dentro de los DAMPs se encuentran las alarminas. Estas moléculas son DAMPs liberados por células que sufren muerte no apoptótica o por células del sistema inmune (Bianchi *et al.*, 2007). Algunos ejemplos de alarminas incluyen HMGB1, proteínas S100, adenosina trifosfato (ATP), ácido úrico, ADN o ARN e interleuquina (IL) como la IL1 $\alpha$ .

Tras la activación de estos receptores PRRs, la microglía se activa y pierde su estado y funciones moleculares homeostáticas (Butovsky *et al.*, 2015; Holtman *et al.*, 2015), pudiendo desencadenar vías de señalización inflamatorias (Perry *et al.*, 2014) (Figura 3). También, realiza funciones de fagocitosis y endocitosis (Hanisch y Kettenmann, 2007; Ransohoff *et al.*, 2009; Prinz *et al.*, 2011), eliminando las células estresadas, defectuosas, necróticas o apoptóticas, e incluso los patógenos presentes en el cerebro (Fricker *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2014). Otros tipos de células, como los astrocitos, las neuronas y las células endoteliales, también pueden presentar receptores de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, pudiendo participar en la respuesta inflamatoria en el cerebro (Heneka, 2014).

### **1.3. ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y NEUROINFLAMACIÓN**

La pérdida o la perturbación funcional de la microglía puede ocurrir en respuesta a la neurodegeneración y contribuir a la patogénesis y a la progresión de la enfermedad. En enfermedades neurodegenerativas, la microglía está expuesta a DAMPs como pueden ser patrones moleculares endógenos mal plegados o mutados o los propios ácidos nucleicos y restos neuronales provenientes de neuronas degeneradas, como por ejemplo, amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ),  $\alpha$ -sinucleína o superóxido dismutasa 1 (SOD1) mutante (Figura 3). Los DAMPs se pueden producir en diferentes procesos neurodegenerativos,

abarcando los procesos complejos que llevan a ello como es la pérdida de integridad de la BHE por traumatismos o alteraciones producidas por el sistema inmune periférico que desregulan las funciones de las células cerebrales (Mosher *et al.*, 2014).

Después de una apropiada activación microglial a través de sus receptores PRRs, estas células son capaces de polarizarse y dar lugar a diferentes fenotipos, dependiendo del estímulo. Clásicamente se le ha otorgado a la microglía dos tipos diferentes de fenotipos extremos o polarizaciones. El fenotipo M1 o proinflamatorio (activación clásica) y el fenotipo M2 o antiinflamatorio (activación alternativa) (Figura 3). Estos diferentes fenotipos se pueden lograr estimulando células microgliales con diferentes compuestos. Así, cuando se estimulan con el lipopolisacárido (LPS) e interferón-gamma (IFN $\gamma$ ), la microglía se polariza hacia el fenotipo activado clásico o M1 (Martínez *et al.*, 2014), mientras que cuando se activan con IL4 la microglía muestra un fenotipo activado alternativo o M2. Para estandarizar la nomenclatura y facilitar la comunicación de los datos de estudios sobre microglía, se ha propuesto una nueva nomenclatura en la que la letra M es seguida por un paréntesis que incluye los estímulos utilizados para la activación (Murray *et al.*, 2014). Hoy en día se sabe que la polarización microglial es un proceso complejo en el que pueden coexistir ambos fenotipos o incluso iniciarse una polarización hacia un fenotipo y modificarse a lo largo del proceso al otro.

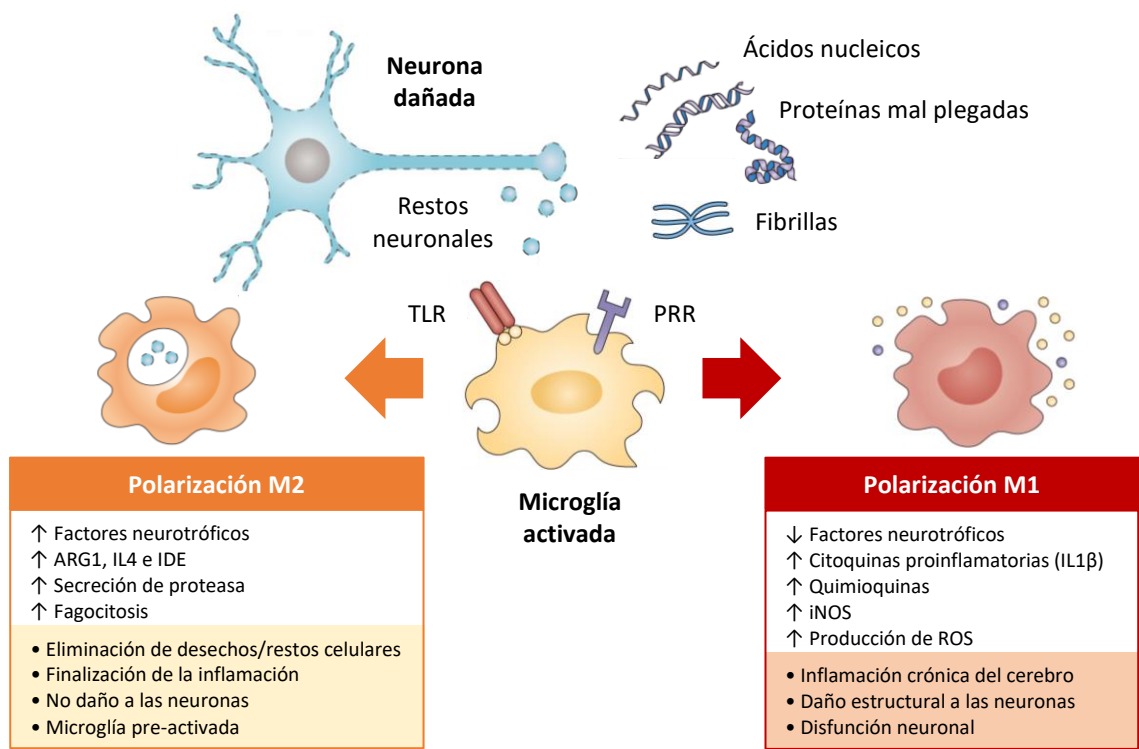
Una característica común de los procesos neurodegenerativos es la neuroinflamación producida por la producción y liberación excesiva, por parte de la microglía proinflamatoria, de citoquinas proinflamatorias de la familia de las IL como es la IL1 $\beta$  y la IL18 (Figura 3). Ambas se expresan inicialmente como proformas biológicamente inactivas que se activan después de la escisión por caspasa-1. La activación de la caspasa-1, a su vez, está controlada por grandes plataformas de

señalización multimoleculares denominadas inflamasomas (Latz *et al.*, 2013). La activación de la microglía proinflamatoria también promueve la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO), a través de la inducción o activación de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPHox) (Shimohama *et al.*, 2000), la mieloperoxidasa (MPO) (Reynolds *et al.*, 1999) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), también conocida como la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) (Vodovotz *et al.*, 1996; Heneka *et al.*, 2001) (Figura 3). Las consecuencias de la activación microglial sostenida es el exceso de liberación de mediadores proinflamatorios, ROS y RNS, los cuales tienen actividad antimicrobiana pero también citotóxica sobre las células vecinas, en particular para las neuronas, pudiendo afectar a procesos involucrados en enfermedades neurodegenerativas como el tratamiento intraneuronal de proteínas (Alirezai *et al.*, 2008), el transporte axonal, la plasticidad sináptica y la neurogénesis adulta (Monje *et al.*, 2003). Además, la neuroinflamación restringe el suministro de factores neurotróficos (Nagatsu *et al.*, 2005), de citoquinas antiinflamatorias y de la reparación celular llevado a cabo por las células gliales con un fenotipo antiinflamatorio (Figura 3).

Por otro lado, la neuroinflamación puede estar inducida por diversos factores externos como un accidente cerebrovascular (ACV), una infección o un traumatismo. Estos procesos podrían producir la rotura de la BHE con la consiguiente extravasación de moléculas proinflamatorias y células inmunes periféricas que podrían activar a la microglía y llegar también a la formación de ROS y NO. Todo ello incrementaría la neurotoxicidad y contribuiría a la neurodegeneración en las enfermedades mediadas por inflamación (McGeer *et al.*, 1988). Además, la neuroinflamación impulsada por células microgliales no solo afecta a las neuronas, sino que también afecta a la propia



población microglial, de forma que puede causar un efecto de retroalimentación perjudicial en situaciones patológicas sostenidas. La microglía no solo causa la muerte neuronal, sino que está activa más microglía, que a su vez libera más moléculas de señalización proinflamatoria en un proceso auto-mantenido y auto-amplificado, y que contribuye a la disfunción neuronal y muerte neuronal. Por lo tanto, la modulación de la activación microglial puede ser uno de los factores más importantes en la prevención de los procesos neurodegenerativos, ya que la eliminación de una excesiva respuesta inflamatoria podría disminuir el daño neuronal (Herrera *et al.*, 2005).



**Figura 3. Activación y polarización microglial. Papel dual de la microglía en el cerebro.** Varias proteínas endógenas (Aβ, α-sinucleína, SOD1 mutante y DAMPs) se pueden unir a receptores de membrana PRRs, como TLR2, TLR4, TLR6, CD36 y TREM2, y promover la activación microglial. Dependiendo de la potencia de señalización, la localización tisular y las condiciones ambientales, la microglía puede responder polarizándose hacia un fenotipo u otro. Típicamente, la activación de la microglía a M2 está asociada con el incremento de la secreción de factores neurotróficos y proteasas, la producción de IL4, la expresión de las enzimas arginasa 1 (ARG1) y la enzima degradadora de insulina (IDE) y un aumento de la actividad fagocítica. Por el contrario, la activación de la microglía a M1 está asociada con la expresión de iNOS, ROS y mediadores proinflamatorios como IL1β y la disminución de la secreción de factores neurotróficos. Estas respuestas divergentes pueden determinar si la actividad de las células microgliales conduce a la eliminación de restos celulares y a la resolución de la respuesta inflamatoria o conduce a una neuroinflamación crónica y continúa pudiendo causar disfunción de las células neuronales y la muerte. Adaptado de Heneka *et al.* *Nature Reviews Immunology* 2014.

#### 1.4. MICROGLÍA ASOCIADA A NEURODEGENERACIÓN

La respuesta inmune innata y la neuroinflamación se desarrollan en diversas enfermedades neurodegenerativas y, de hecho, pueden promover la patología. Los DAMPs pueden servir directamente como desencadenantes de la respuesta neuroinflamatoria en diferentes tipos de células cerebrales y promover un estado sostenido proinflamatorio que desvía las células inmunocompetentes del cerebro, como la microglía, de sus funciones homeostáticas o de protección, a favor del desarrollo y progresión de la enfermedad neurodegenerativa a través de la liberación auto-sostenida de mediadores proinflamatorios (Heneka *et al.*, 2014).

Estudios recientes han identificado un fenotipo microglial neurodegenerativo asociado a daño (DAM) (Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017), el cual es desencadenado por la señalización de TREM2 (Wang *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018). Este fenotipo neurodegenerativo conlleva la represión de numerosos genes asociados al fenotipo microglial homeostático, perdiendo con ello la capacidad de regular la homeostasis cerebral. Recientemente Ido Amit, Marco Colonna y colaboradores han sugerido que la transición de microglía homeostática a DAM está asociada a la liberación de patrones moleculares asociados a neurodegeneración (NAMPs), análogo al modelo de los DAMPs y PAMPs, iniciándose la activación microglial y respuesta inmune con la unión de estos al receptor TREM2. Parece que la activación de TREM2 estaría relacionada con el mantenimiento de la activación, proliferación y supervivencia de la DAM a través de las vías PI3K/AKT/mTOR (Peng *et al.*, 2010; Ulland *et al.*, 2017).

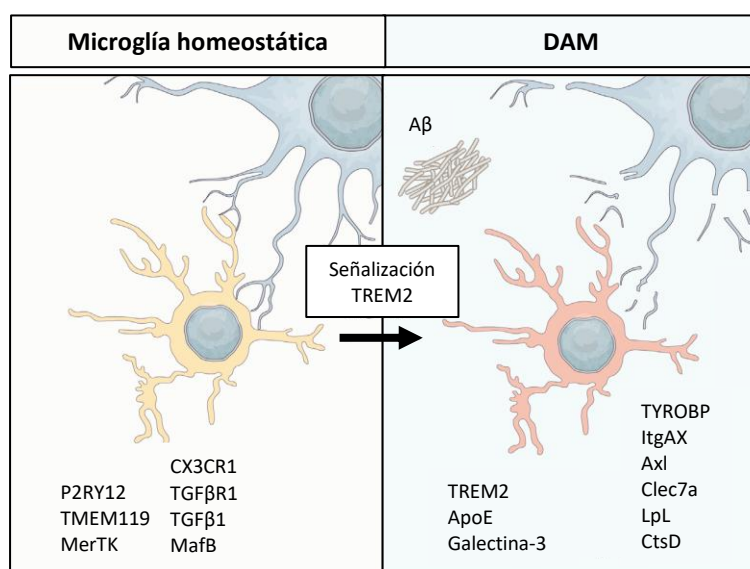
Los NAMPs incluyen moléculas señales de daño neuronal presentes en los cuerpos apoptóticos, restos de mielina, productos de degradación de lípidos, agregados de proteínas extracelulares típicos de enfermedades neurodegenerativas y del

envejecimiento (por ejemplo, A $\beta$ ) y otras señales de daño neuronal como las purinas extracelulares (por ejemplo, ATP) (Poliani *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017; Deczkowska *et al.*, 2018). De hecho la fagocitosis de restos de neuronas apoptóticas suprime el estado homeostático microglial (Krasemann *et al.*, 2017).

Es importante destacar que la DAM se ha detectado principalmente en las regiones del SNC afectadas por la enfermedad de Alzheimer (EA), estando solo presentes en las zonas afectadas por las placas de A $\beta$  (Figura 4), con las cuales colocalizan (Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017; Deczkowska *et al.*, 2018). También se han observado en regiones afectadas por la enfermedad de Parkinson (EP) (Leyns *et al.*, 2017; Friedman *et al.*, 2018) y otras enfermedades neurodegenerativas, así como en el envejecimiento (Holtman *et al.*, 2015; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Mrdjen *et al.*, 2018; Olah *et al.*, 2018).

Este subconjunto de células microgliales se han podido identificar gracias a técnicas de secuenciación de ARN de una sola célula que mostraron un panel transcripcional y funcional único y específico en las llamadas DAM (Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017). Gracias a estas técnicas se sabe que el paso de un estado homeostático a DAM desencadena la disminución de la expresión de genes típicos de la microglía homeostática. Entre estos genes se encuentra el receptor purinérgico P2RY12 que reconoce adenosina difosfato (ADP) extracelular. El ADP es una de las señales universales de daño neuronal (Rodrigues *et al.*, 2015; Keren-Shaul *et al.*, 2017) que actúa induciendo quimiotaxis microglial hacia las regiones dañadas así como la fagocitosis de los restos celulares (Davalos *et al.*, 2005; Abiega *et al.*, 2016). También se reduce la expresión de CX3CR1, TGF $\beta$ R1, MafB y la proteína transmembrana 119

(TMEM119) (Butovsky *et al.*, 2014; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017) (Figura 4). Por otro lado, la señalización dependiente de TREM2 implica la regulación positiva de las vías del metabolismo lisosómico, fagocítico y lipídico, tales como la apolipoproteína E (ApoE), catepsina D (CtsD), lipoproteína lipasa (LPL), proteína de unión a la proteína tirosina quinasa TYRO (TYROBP), Axl, Clec7a o dectina-1, CD11c o integrina alfa X (ItgAX), el propio TREM2 (Lambert *et al.*, 2013; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017) y la galectina-3 (Krasemann *et al.*, 2017; Mathys *et al.*, 2017) (Figura 4). Además, la DAM se caracteriza molecularmente por la expresión de marcadores microgliales típicos como Iba1 y Hexb (hexosaminidasa B) (Keren-Shaul *et al.*, 2017; Krasemann *et al.*, 2017; Mathys *et al.*, 2017) (Figura 4).



**Figura 4. Inducción de la microglía homeostática a la DAM.** La señal TREM2 es necesaria para la inducción de la DAM. Cada etapa se caracteriza por una firma transcripcional única. Adaptado de Deczkowska *et al. Cell* 2018.

Como en el sistema inmune periférico, donde la activación inmune puede tener consecuencias perjudiciales para el tejido circundante si no está compensado por reguladores negativos, la microglía está equipada con un conjunto de mecanismos de restricción, como por ejemplo los receptores CX3CR1 y CD200 que al interactuar con sus ligandos promueven el estado homeostático microglial (Biber *et al.*, 2007). De este

modo, estos puntos de control posiblemente compitan con la activación de la microglía mediante la señalización por NAMPs y la transición a DAM (Deczkowska *et al.*, 2018). Por consiguiente, la expresión de moléculas CX3CR1 y CD200 disminuye el estado neurodegenerativo de la microglía (Figura 4), lo que puede sugerir que el bloqueo de ciertos mecanismos de restricción puede ser un requisito previo para la adquisición del fenotipo DAM (Keren-Shaul *et al.*, 2017). Este sistema se puede ver desregulado en situaciones fisiológicas como en el envejecimiento (Galatro *et al.*, 2017), un proceso que afecta a varias facetas de la función del SNC, incluida la disminución de la actividad fagocítica microglial (Safaiyan *et al.*, 2016) y de la transformación de la microglía residente a la DAM (Deczkowska *et al.*, 2017; Keren-Shaul *et al.*, 2017).

La identificación de NAMPs específicos y sus receptores, así como sus reguladores positivos y negativos junto con el desarrollo de agonistas y antagonistas farmacológicos de los receptores, supondrían un gran avance en la comprensión de la base molecular de muchas de las enfermedades del SNC y posiblemente revelarían nuevas oportunidades terapéuticas. Uno de las moléculas reguladas positivamente en la microglía activada y DAM es la galectina-3. Esta proteína es un inmunomodulador por lo que podría tener el papel de modular el estado microglial, ya sea, a estados homeostáticos y DAM o a microglía M1 y M2, además de regular funciones como la fagocítica. Estudios recientes transcriptómicos realizado a partir de una única célula han demostrado que la galectina-3 es uno de los genes más fuertemente inducidos en modelos animales de diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo EA, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y envejecimiento, sugiriendo un papel como regulador principal durante la respuesta inflamatoria en enfermedades neurodegenerativas (Krasemann *et al.*, 2017; Mathys *et al.*, 2017).

## 2. LAS GALECTINAS

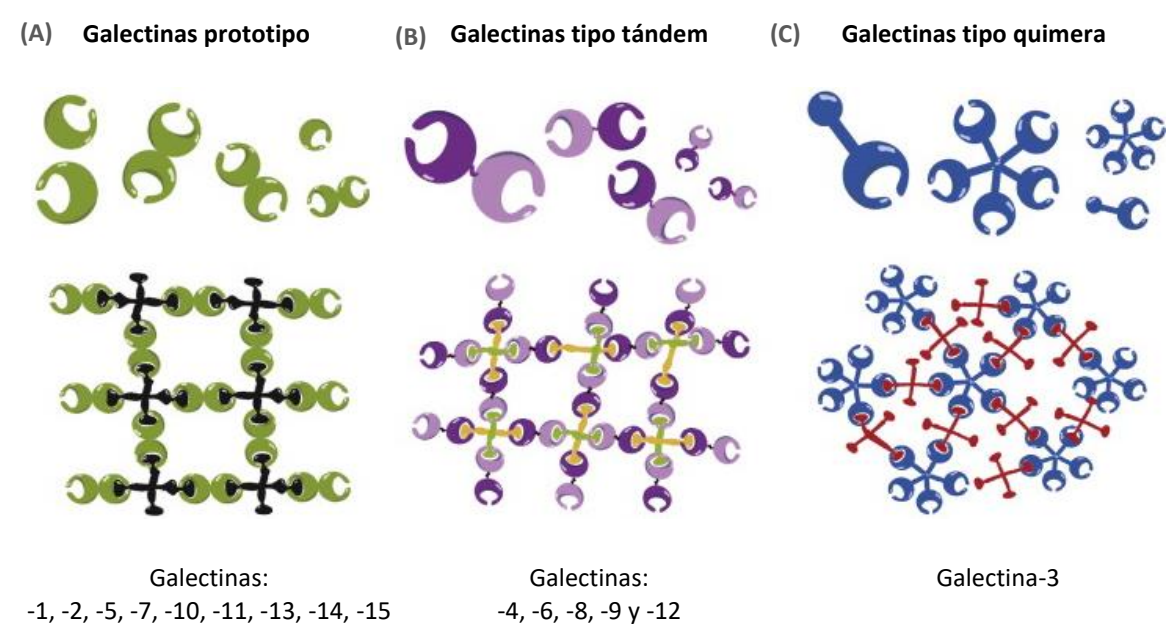
Las galectinas son lectinas de unión a  $\beta$ -galactósidos formadas por unos 15 miembros que se caracterizan por la presencia de un dominio de reconocimiento de carbohidratos o DRC, de unos 130 aminoácidos con afinidad a  $\beta$ -galactósidos (Leffler *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2007).

### 2.1. TIPOS

Se dividen en 3 grupos según su estructura (Yang *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2015). Las del primer grupo se llaman **galectinas prototipo** (Figura 5A), las cuales presentan un único DRC (galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15). El segundo grupo está formado por las **galectinas tipo tándem** (Figura 5B), que contienen dos DRC homólogos en una única cadena polipeptídica unidos por una región de unión que es variable, lo que les confiere distinta especificidad (galectinas-4, -6, -8, -9 y -12). El tercer y último grupo es el de las **galectinas tipo quimera, cuyo único miembro es la galectina-3** (lectina de unión a galactosa 3) (Figura 5C). La galectina-3 es una proteína de 263 aminoácidos y 35 kDa, con tres dominios estructurales: un dominio N-terminal que contiene un sitio de fosforilación de serina, un segundo dominio similar al colágeno rico en prolina y escindible por metaloproteasas, y un dominio C-terminal que contiene un único dominio DRC (Rahimian *et al.*, 2018).

Esta diferencia estructural se manifiesta más claramente cuando interaccionan entre ellas o con sus ligandos (carbohidratos) (Yang *et al.*, 2008). Las galectinas prototipo se encuentran de forma monomérica o dimérica (Figura 5A), pero solo reconocen un tipo de ligando. Las galectinas tipo tándem se encuentran en dímeros pero pueden reconocer dos ligandos distintos a la vez (Figura 5B).

Por último, la galectina-3 es capaz de formar oligómeros (pentámeros) uniéndose varias de estas proteínas a través de su dominio N-terminal (Figura 5C) (Rabinovich *et al.*, 2007). Estas uniones les permite generar agregados bivalentes o multivalentes con carbohidratos multivalentes, lo que permite el reconocimiento de múltiples patrones de unión y la activación de distintas vías de señalización. Este dominio N-terminal está involucrado también en la liberación de la proteína y en la actividad antiapoptótica de la galectina-3 (Gong *et al.*, 1999; Yoshii *et al.*, 2002). Por otro lado, el dominio C-terminal interactúa con el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGFR1) glucosilado y potencia su señalización (Liu, Patterson y Wang, 2002; Partridge *et al.*, 2004; Rabinovich *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2009; Radosavljevic *et al.*, 2012; Funasaka, Raz y Nangia-Makker, 2014; Suarez y Meyerrose, 2014).



**Figura 5. Representación de los tres tipos de galectinas según su estructura y estructuras teóricas que pueden formar con ligandos tetravalentes.** A, prototipo, forman dímeros. B, tipo tándem, tienen dos sitios de unión. C, tipo quimera o galectina-3, forman pentámeros. Adaptado de Yang *et al. Brain research* 2013

## 2.2. FUNCIONES

Las galectinas ejercen complejas funciones, pues cada galectina provoca una respuesta diferente y cada tipo celular posee un patrón diferente de expresión de galectinas y glucoconjugados (Lowe, 2001). Las funciones que se les atribuyen son muy variadas, pudiendo desempeñar funciones diversas como reguladores endógenos de diferentes procesos como la proliferación, la adhesión, la migración, la invasión, la angiogénesis, la apoptosis, la modulación tumoral, la respuesta inflamatoria y mediar en la neurodegeneración (Rabinovich *et al.*, 2007; Toscano *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2009; Newlaczyl *et al.*, 2011; Sundblad *et al.*, 2011; Shin, 2013)

Hay autores que distinguen entre las funciones intracelulares y extracelulares. Recientemente se ha demostrado que las galectinas pueden ser secretadas y ejercer funciones de reconocimiento de múltiples glicanos, siendo capaces de provocar la activación de las células inmunes, así como participar tanto en procesos de homeostasis como de diferenciación celular. Sin embargo, también pueden actuar desde la membrana celular, quedando ancladas y reconociendo los glicanos que puedan quedar en contacto con el exterior de la célula, como en los casos de adhesión celular o comunicación entre células inmunes. A nivel intracelular destaca su función reguladora de la transcripción génica y moduladora en determinadas vías de señalización, regulando la viabilidad celular y la apoptosis. En cuanto a sus principales funciones a nivel extracelular destaca su papel en la adhesión celular, la migración, la quimiotaxis y la proliferación (MacKinnon *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010).

En el caso de la galectina-3 (y también la galectina-10) se han descubierto ciertas funciones intracelulares capaces de modular la supervivencia celular y el procesamiento alternativo o *splicing* del ARNm. Las galectinas tienen también un papel regulador en la



respuesta inmune, siendo las galectina-1 y -9 inductores de la apoptosis en células T activadas, la galectina-3 activador de neutrófilos, y la galectina-9 quimioatrayente para eosinófilos. Además, pueden modular la función celular de forma autocrina o paracrina por medio de la unión de glucoconjugados a la superficie celular (Gruson y Ko, 2012). Además, estas funciones dependen del tipo celular, tisular y de las circunstancias (Li *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010; Funasaka, Raz y Nangia-Makker, 2014; Burguillos *et al.*, 2015; Sirko *et al.*, 2015).

A nivel del SNC, las galectinas que se expresan principalmente son las galectinas-1, -3, -4, -8 y -9 (Stancic *et al.*, 2011), las cuales presentan una distribución diferencial en el mismo. A nivel celular, la galectina-1 se expresa principalmente en células neuronales y células madre neurales, mientras que la galectina-3 es expresada por la microglía mayoritariamente (Pasquini *et al.*, 2011; Lerman *et al.*, 2012). De este modo, en condiciones fisiológicas presentan diversas funciones en el mantenimiento de la homeostasis en el SNC, participando en la mielinización, la proliferación celular y el transporte apical de vesículas. Por el contrario, en condiciones patológicas, algunas de ellas son inducidas en la microglía (como la galectina-3) y neuronas, pudiendo contribuir a la regeneración neuronal o bien a la degeneración Walleriana (Chen *et al.*, 2014).

### 2.3. FUNCIONES DE LA GALECTINA-3

La estructura de la proteína galectina-3 y su ubicuidad le confiere unas posibilidades diferentes al resto de proteínas de su familia, adoptando un amplio abanico de funciones diferentes según su localización celular (extracelular, citoplasma y núcleo) (MacKinnon *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010) y el tipo de célula en el que se expresa (Li *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010; Funasaka *et al.*, 2014; Burguillos *et al.*, 2015; Sirko *et al.*,

2015). Entre ellas, la galectina-3 participa en la activación celular, la proliferación, la migración y la apoptosis y se ha asociado con la respuesta inmune e inflamatoria. Cabe destacar que la glicosilación puede cambiar de forma importante según el proceso biológico (Marth *et al.*, 2008; van Kooyk *et al.*, 2008) creando diferentes ambientes sobre los que actúan las lectinas. Todo ello podría explicar los efectos distintos y en apariencia contradictorios que se le atribuyen a esta proteína.

A **nivel nuclear** se ha asociado su función con el *splicing* del ARNm así como con la proliferación celular (Dagher *et al.*, 1995), regulando la expresión de oncogenes y genes relacionados con el ciclo celular. Sin embargo, su función en el cáncer no está clara y probablemente dependa de cada línea celular y de las modificaciones post-traduccionales propias de cada línea, puesto que se le ha conferido a esta proteína una función proliferativa y metastásica en ciertas líneas tumorales mientras que en otras se ha visto que protege frente a la progresión del tumor (Funasaka *et al.*, 2014).

A **nivel citoplasmático** la proteína se encuentra ya fosforilada y su función más destacada parece ser antiapoptótica, ya que parece reclutar a la proteína de linfoma de células B 2 (Bcl2) a través de sus dominios homólogos NWGR (Yang *et al.*, 1996). Además, se ha visto que la galectina-3 induce la proliferación, la diferenciación y la supervivencia, a través de la señalización mediada por KRas (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

La galectina-3 no utiliza la vía de secreción del retículo endoplásmico y Golgi clásica (Menon *et al.*, 1999) para ser excretada al medio extracelular, por lo que utiliza una vía secretora alternativa que incluye vesículas y/o exosomas específicos para la secreción y exportación de la galectina-3 (Sato *et al.*, 1994; Hughes, 1999; Théry *et al.*, 2001). Estas vesículas podrían fusionarse directamente con otras células, dando como resultado la captación de la galectina-3 por las células receptoras o la interacción con

receptores extracelulares (Dumic *et al.*, 2006). De hecho, la galectina-3 se puede encontrar en líquidos corporales tras un TBI (Shan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016), confiriéndole propiedades incluso como biomarcador de ciertas enfermedades o cuadros clínicos como un fallo cardíaco (Suarez *et al.*, 2014), en lesiones ateroscleróticas (Papaspnyridonos *et al.*, 2008) o artritis reumatoide (Ohshima *et al.*, 2003).

A **nivel de membrana** es donde parece tener mayor influencia en el sistema inmune ya que son varios los estudios que demuestran la interacción de la galectina-3 con distintos receptores de membrana de células inmunes (Rabinovich *et al.*, 2009). Un hecho a destacar es que la galectina-3 unida a la superficie extracelular puede alterar la dinámica de varios receptores de membrana. Esto, por ejemplo, puede provocar un aumento en el tiempo de retención de esos receptores en la superficie celular (Partridge *et al.*, 2004; Dennis *et al.*, 2009) pudiendo aumentar la potencia de la señal inducida por el receptor. Esto es observado, por ejemplo, en las interacciones de la galectina-3 con N-glicanos unidos a diversos receptores de factores de crecimiento, como el IGFR1, dando como resultado el aumento del crecimiento celular (Partridge *et al.*, 2004). Este mecanismo se ha propuesto también para el aumento en la velocidad de crecimiento observado en células cancerosas y donde está regulada positivamente la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa 5 (Mgat5). Estos N-glicanos se adicionan a los receptores gracias a la acción de esta enzima, dirigiendo así la acción de la galectina-3 (Partridge *et al.*, 2004). Partridge y sus colaboradores descubrieron que en los animales que carecían de dicha enzima, disminuía la extravasación de leucocitos al espacio intraperitoneal, así como su capacidad fagocítica (Partridge *et al.*, 2004). Sin embargo, la función de la galectina-3 vuelve a depender de la línea celular, ya que en un estudio realizado sobre los linfocitos T, la galectina-3 tenía un efecto antiinflamatorio actuando

sobre los receptores de células T (TCR) de la membrana plasmática, formando complejos con N-glicanos de estos receptores, inmovilizándolos y disminuyendo su funcionalidad e impidiendo así que interaccionen con las células presentadoras de antígenos (Demetriou *et al.*, 2001).

A **nivel extracelular**, y en algunos casos como el de ciertos tumores, la galectina-3 puede inactivar la respuesta inflamatoria de linfocitos T citotóxicos por un proceso similar al comentado anteriormente, ya que une varios receptores TCR e impide su acercamiento a co-receptores como CD8, impidiendo así la activación de la célula (Demotte *et al.*, 2008). Efectos antiinflamatorios han sido igualmente puestos de manifiesto en macrófagos y monocitos en los que la galectina-3 reduce el efecto proinflamatorio de ligandos de TLR4 como el LPS (Li *et al.*, 2008), probablemente impidiendo el acercamiento de TLR4 a su cofactor CD14. Por el contrario, en el caso de los neutrófilos, la presencia de la galectina-3 aumenta la activación de los receptores expuestos a LPS por una interacción directa galectina-3/LPS (Fermino *et al.*, 2011). Además, en condiciones *in vitro* se ha detectado que la galectina-3 añadida al medio tiene propiedades proapoptóticas hacia ciertas poblaciones de linfocitos T (Fukumori *et al.*, 2003), lo que sugiere que la galectina-3 puede inducir *per se* la activación de ciertas rutas bioquímicas de muerte celular.

Los **modelos de animales transgénicos** en los cuales no hay expresión de la galectina-3 ya que tienen eliminado el gen que la codifica (animales KOGal3), son la mejor vía para estudiar la influencia de esta proteína en los mecanismos biológicos. Así, se sabe de forma general que los animales que de forma constitutiva no expresan la proteína galectina-3 tienen una respuesta inmune atenuada de los linfocitos T (Jiang *et al.*, 2009), así como una menor respuesta inmune ante diferentes estímulos como

asma (Zuberi *et al.*, 2004) o parasitosis (Bernardes *et al.*, 2006; Breuilh *et al.*, 2007). Entre las posibles causas surge la posibilidad de que esta proteína tenga una función destacada en la maduración de las células T, ya que se expresa en el timo, regulando la supervivencia de distintas subpoblaciones de células inmunes (Stillman *et al.*, 2006; Vasil'eva *et al.*, 2013). Por otra parte, las células dendríticas de los animales deficientes en la galectina-3 ven perjudicada su capacidad migratoria (Bernardes *et al.*, 2006). Otros estudios recientes han demostrado que los ratones KOGal3 tratados con dextran sulfato sódico (DSS) eran más susceptibles a la infección por *Candida albicans*, pero tenían menos signos de colitis ulcerosa y baja producción de citoquinas proinflamatorias (Jawhara *et al.*, 2008). Esto, concuerda con estudios recientes donde se observa que la galectina-3 juega un papel proinflamatorio muy importante en la fase de inducción en un modelo de colitis ulcerosa, promoviendo la activación del inflamasoma NLRP3 y la producción de IL1 $\beta$  en macrófagos, sugiriéndola así como posible diana terapéutica (Simovic Markovic *et al.*, 2016).

Por todo lo expuesto, se puede concluir que las funciones de la proteína galectina-3 son probablemente demasiado complejas como para atribuirle una única función principal. Su particular estructura y la capacidad de actuar en diferentes localizaciones celulares le confieren un abanico de posibilidades muy extenso y más aún cuando tenemos en cuenta las diferentes funciones según el ambiente en el que se encuentre, marcado por las diferencias en la glicosilación de proteínas.

## 2.4. LA GALECTINA-3 EN LA RESPUESTA INMUNE EN EL SNC

La activación y proliferación de la microglía son un sello distintivo de muchos tipos de lesiones cerebrales, incluido el ACV y enfermedades neurodegenerativas. En

condiciones fisiopatológicas, la microglía adopta diferentes perfiles de polarización según el estímulo, pudiendo adquirir un amplio repertorio de perfiles inmunitarios que van desde proinflamatorios clásicos a fenotipos antiinflamatorios y neuroprotectores alternativos (David *et al.*, 2011; Ransohoff *et al.*, 2012; Kierdorf *et al.*, 2013). Esta activación microglial y la consiguiente respuesta inflamatoria en el SNC se ha demostrado que es clave en la isquemia cerebral (Lambertsen *et al.*, 2012) y en los trastornos neurodegenerativos (Burguillos *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011).

Sin embargo, los mecanismos que impulsan el desarrollo de distintos perfiles microgliales inmunes siguen sin estar claros. Una de las posibles moléculas con funciones inmunomoduladoras en este proceso podría ser la galectina-3. Además, esta proteína es altamente expresada en la microglía activada (Lalancette-Hébert *et al.*, 2007), mientras que en la microglía en reposo o homeostática es casi inexistente. Así pues, la galectina-3 en el SNC parece funcionar como un regulador principal durante la respuesta inmune, actuando en la proliferación, activación, polarización y producción de citoquinas microgliales. La galectina-3 puede tener funciones contradictorias como ya se ha comentado anteriormente. En el caso de la microglía puede modular y desencadenar tanto las propiedades proliferativas y de activación alternativa antiinflamatoria de la microglía al potenciar la señalización de IGFR, como promover su fenotipo proinflamatorio activando el receptor TLR4 y los factores de transcripción inflamatorios como el factor nuclear NF- $\kappa$ B.

En modelos de lesión isquémica se ha observado una robusta regulación positiva de la galectina-3 en la microglía activada, sugiriendo su papel en la activación y proliferación a través de IGF1 (Lalancette-Hébert *et al.*, 2007, 2012; Rotshenker, 2009). Además, la administración central y periférica de IGF1 se ha asociado con la

recuperación posterior al ACV y la neuroprotección, disminuyendo el daño cerebral y provocando la neurogénesis y acelerando la supervivencia neuronal (Sohrabji *et al.*, 2013). Trabajos previos sugieren que la galectina-3, al unirse a los glicanos unidos a los GFR, oligomerizan los receptores en la superficie celular y retrasan su eliminación por endocitosis, dando como resultado la prolongación de la señalización. Esta teoría fue confirmada con los resultados obtenidos en cerebros isquémicos de ratones KOGal3 donde se observó una marcada reducción del 50% en la proliferación (Lalancette-Hébert *et al.*, 2012), produciendo un aumento del daño isquémico y la apoptosis neuronal con sobreexpresión de IL6 (Rotshenker, 2009; Lalancette-Hébert *et al.*, 2012). Por otro lado, en modelos de ELA, los animales que constitutivamente son incapaces de sintetizar galectina-3 tienen mayor respuesta proinflamatoria en términos de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Lerman *et al.*, 2012).

Por el contrario, varios grupos, incluido el nuestro, han demostrado que la galectina-3 en el SNC es liberada al medio extracelular por la microglía reactiva en respuesta a estímulos proinflamatorios como el LPS (Li *et al.*, 2008; Burguillos *et al.*, 2015) y IFN $\gamma$  (Jeon *et al.*, 2010), siendo fundamental para la inducción temprana de la respuesta inmune innata en el SNC. Esta galectina-3 liberada actúa como ligando paracrino endógeno del receptor TLR2 (Lalancette-Hébert *et al.*, 2012) y TLR4 (Burguillos *et al.*, 2015) pudiendo inducir una respuesta inflamatoria y activación microglial mediada por este último receptor. Nuestro grupo observó que esta interacción con TLR4 era esencial para la respuesta microglial completa después del tratamiento con un ligando del receptor TLR4 como el LPS (Burguillos *et al.*, 2015). Además, estudios previos demostraron que la galectina-3 participa en la respuesta proinflamatoria desencadenada en células microgliales por formas agregadas de  $\alpha$ -sinucleína (Boza-

Serrano *et al.*, 2014), un sello distintivo de la fisiopatología de la EP. De hecho, hemos observado que los ratones KOGal3 eran más resistentes a la degeneración hipocampal en la región CA1 (*Cornu Ammonis 1*) en un modelo de isquemia cerebral global que imita el daño cerebral causado por un paro cardíaco (Burguillos *et al.*, 2015), sugiriendo que la galectina-3 secretada por la microglía podría tener un papel importante en la comunicación intercelular que media la respuesta neuroinflamatoria asociada a la neurodegeneración (Satoh *et al.*, 2011; Satoh *et al.*, 2011). Por este motivo, una modulación de la secreción de la galectina-3 podría proporcionar un concepto interesante y posible vía terapéutica en condiciones de neuroinflamación asociadas a neurodegeneración, como ya se ha observado en casos de ACV (Zhang *et al.*, 2016). En un interesante trabajo en el cual inducían encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal de inflamación y desmielinización usado en el estudio de la esclerosis múltiple (EM) (Jiang *et al.*, 2009), se determinó que los animales KOGal3 tenían menor infiltración de leucocitos en el SNC y presentaban un menor desarrollo de la enfermedad. Además, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) no detectaron TNF $\alpha$ , iNOS y otras citoquinas proinflamatorias típicas de un fenotipo microglial proinflamatorio, hecho que si fue observada en los animales controles, demostrando el importante papel de la galectina-3 en los procesos inflamatorios del SNC (Jiang *et al.*, 2009).

Aparte de la implicación de la galectina-3 sobre la respuesta inmune y microglial en situaciones de lesión cerebral y a través de la activación del receptor TLR4, se ha demostrado que la galectina-3 actúa como ligando del receptor microglial fagocítico tirosina quinasa MER (MerTK), actuando como opsonina (Nomura *et al.*, 2017) y ejerciendo por tanto como señal de "cómeme", estimulando así la fagocitosis microglial



de neuronas vivas estresadas (Fricker *et al.*, 2012; Neher *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2016)

En definitiva, esta galectina lleva a cabo actividades promotoras en algunas células y supresoras en otras (Yang *et al.*, 2008), muchas veces debido a sus diferentes funciones según realice su acción en el espacio intracelular y extracelular (MacKinnon *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010). Así pues, la galectina-3 presenta efectos pleiotrópicos en el SNC, y no sólo en la respuesta inflamatoria, sino también sobre la capacidad remodeladora en respuesta al daño neuronal (Shin, 2013).

## 2.5. LA GALECTINA-3 EN LA REMODELACIÓN TISULAR EN EL SNC

Una lesión cerebral desencadena el proceso de neurogénesis endógena en las regiones del cerebro donde la neurogénesis adulta normalmente no existe. La neurogénesis inducida por la lesión puede contribuir a la plasticidad neuronal y a la recuperación cerebral post-isquémica. Los mecanismos moleculares implicados en la regulación de dicha neurogénesis siguen siendo desconocidos. Algunos estudios defienden que la inflamación actúa como un mediador clave. Otros observan que la inflamación tiene un efecto perjudicial (Monje *et al.*, 2003; Ekdahl *et al.*, 2009) por lo que el tratamiento con agentes antiinflamatorios después del ACV induciría la neurogénesis y mejoraría la recuperación funcional tras la lesión cerebral (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, nuevos estudios sugieren que el papel de la respuesta inflamatoria en la neurogénesis adulta podría depender de las interacciones directas entre los progenitores y las células gliales activadas (Kriz *et al.*, 2009).

Los estudios sobre el papel de la galectina-3 en la neurogénesis posterior a la lesión cerebral son escasos. Algunos autores le asignan un papel como promotor de la

proliferación de progenitores neuronales en cultivo. Dichos autores sugieren que la inhibición de la galectina-3 en el cerebro isquémico disminuye el número de células proliferativas en la zona subventricular ipsilateral (Yan *et al.*, 2009). Además, la galectina-3 extracelular producida y secretada por la microglía potencia la supervivencia celular, la migración y la angiogénesis. Un nuevo estudio mostró que la galectina-3 protege a la microglía de la línea celular BV2 expuesta a condiciones isquémicas mediante la inducción de la supervivencia a través de la quinasa unida a integrina (ILK) (Wesley *et al.*, 2013). La ILK es una quinasa que regula varias moléculas que promueven la proliferación, la supervivencia y la migración. Es importante destacar que ILK modula la expresión del factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ) mediado por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ambos esenciales para la migración de células endoteliales, la formación de tubos y la angiogénesis. También está involucrada en la señalización de vías como la de Akt y ERK1/2, los cuales se fosforilan y se translocan al núcleo, fosforilando y activando a su vez varios factores de transcripción que regulan directamente los genes necesarios para la proliferación celular y la síntesis de ADN (Saito *et al.*, 2004; Wesley *et al.*, 2013). Por lo tanto, la activación de la señalización ILK por la galectina-3 podría ser responsable de la supervivencia neuronal, neovascularización y migración después de la isquemia cerebral (Saito *et al.*, 2004; Wesley *et al.*, 2013).

En resumen, la evidencia sugiere que la galectina-3 a través de la activación de diferentes vías puede orquestar la angiogénesis posterior al ACV, la neurogénesis, la migración de neuroblastos y la inflamación. Todos estos efectos tienen un importante potencial de traducción para el diseño de nuevas clases de moduladores terapéuticos de la galectina-3 para contrarrestar la muerte neural por daño cerebral post-isquemia y mejorar la recuperación.

## 2.6. MODULADORES DE LA GALECTINA-3

En la periferia, las interacciones proteína-carbohidrato mediadas por la galectina-3 tienen un papel fundamental en la regulación de la fibrosis, la función inmune, la progresión del cáncer y la metástasis (Ahmed *et al.*, 2015). Aunque la galectina-3 puede tener un potencial terapéutico interesante como molécula inmunomoduladora en el SNC, hasta la fecha no existe un modulador de la galectina-3 aprobado por la FDA. Existen potenciales objetivos terapéuticos en los trastornos neurodegenerativos, incluido el ACV y la lesión cerebral, que deberían tenerse en cuenta por el papel principal observado de la galectina-3 en la respuesta inmune del SNC, modulando la morfología, proliferación, activación y polarización microglial, e incluso la regeneración neuronal.

A día de hoy, sólo se han diseñado algunos farmacóforos para el desarrollo de inhibidores de la galectina-3 para el tratamiento del cáncer, la insuficiencia cardíaca y la enfermedad fibrótica pulmonar. Los derivados del tiodigalactósido (TDG) son los antagonistas químicos de la galectina-3 más potentes sintetizados hasta ahora y suprimen el crecimiento tumoral al evitar las actividades de las galectinas que potencian el desarrollo y supervivencia del cáncer (Blanchard *et al.*, 2014). Entre los inhibidores y moduladores de la galectina-3, TD-139 ha entrado en ensayos clínicos de Fase II. TD-139 se administra por inhalación para la fibrosis pulmonar idiopática. Es un inhibidor potente y específico de la unión de la galectina-3 a galactósidos que ha demostrado tener un papel central en el desarrollo y la progresión de la fibrosis inducida por macrófagos (MacKinnon *et al.*, 2012).

### 3. DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO (TBI)

La lesión cerebral traumática o TBI fue definida recientemente como “Una alteración en la función cerebral, u otra evidencia de patología cerebral, causada por una fuerza externa” (Menon *et al.*, 2010).

La lesión cerebral traumática se ha convertido en una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo occidental (Das *et al.*, 2012), siendo muy frecuente en estos países con independencia del nivel de sus ingresos y edad de la población. Además, existe una subestimación de la incidencia real y un desconocimiento por parte de la sociedad del impacto o repercusiones de la lesión cerebral traumática (Koskinen *et al.*, 2008). Los estudios epidemiológicos de TBI son esenciales para la prevención y el tratamiento efectivo de los pacientes con esta lesión cerebral. Tagliaferri realizó una revisión sistemática sobre la epidemiología del TBI en Europa en 2006, donde analizaron 23 estudios publicados entre 1980 y 2003. A través de esta revisión, se estimó que el TBI afecta a 2,5 millones de personas por año en Europa (Tagliaferri *et al.*, 2006). En la última década, han surgido nuevos conocimientos sobre la epidemiología del TBI en los que se muestran patrones epidemiológicos donde parece estar aumentando la incidencia en los ancianos (Peeters *et al.*, 2015) aunque varios informes afirman que la mortalidad está disminuyendo (Ghajar, 2000; Lu *et al.*, 2005; Gerber *et al.*, 2013).

La patología que desencadena el TBI produce un complejo conjunto de síntomas que a largo plazo pueden llegar afectar a la función cognitiva y desencadenar demencia, EP y ELA (Pearce *et al.*, 2015). Las acciones rápidas tanto en la estancia pre-hospitalaria como en la hospitalaria se consideran factores clave para disminuir la mortalidad y mejorar el resultado neurológico del paciente con TBI (Brazinova *et al.*, 2015).

Un daño cerebral traumático se puede dividir en varias etapas. Una **primera etapa o lesión primaria**, caracterizada y debida al impacto, contusión o traumatismo inicial, donde se produce un daño tisular directo y se desencadena la respuesta inmune en el cerebro. Una **segunda etapa o lesión secundaria**, caracterizada por la propagación de la pérdida celular o neurodegeneración, daño axonal difuso y también una respuesta neuroinflamatoria multifásica. Esta etapa es en parte consecuencia de la respuesta inmune desencadenada por la lesión primaria (Hellewell *et al.*, 2016). Y una **tercera etapa**, caracterizada por el intento de regeneración y reparación por parte del organismo.

Una de las líneas importantes en el diseño de terapias efectivas contra el TBI radica en controlar los principales eventos posteriores al traumatismo, como la inflamación, la cual puede actuar como un arma de doble filo en las complejas circunstancias patológicas.

### 3.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A TBI

Uno de los primeros mecanismos de defensa que se activa después de un traumatismo craneoencefálico es la respuesta inmune innata y, con ello, la microglía. Se ha demostrado que la activación de los miembros de la familia del receptor TLR desempeñan un papel importante en diferentes lesiones o infecciones del SNC y durante la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas (Hanamsagar *et al.*, 2012).

Después del TBI se liberan alarminas (Manson *et al.*, 2012) desencadenando una respuesta inmune en un intento estéril de restaurar la homeostasis del tejido. La liberación de estas alarminas o DAMPs después de la lesión activa los TLRs presentes en las células microgliales (Chen *et al.*, 2010), y desencadena la respuesta inmune

(Hennessy *et al.*, 2010). Entre los diferentes miembros de TLRs, se ha demostrado que TLR2 y TLR4 desempeñan un papel clave durante la respuesta neuroinflamatoria en diversos modelos experimentales de TBI (Park *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013; Hayward *et al.*, 2014; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Además, en el caso del TBI se produce una rotura de la BHE con la consiguiente extravasación de moléculas proinflamatorias y células inmunes periféricas que podrían activar a la microglía y podrían aumentar aún más la formación de ROS y NO incrementando la neurotoxicidad y contribuyendo a la neurodegeneración.

Desde su descubrimiento en 1996, el miembro TLR4 de la familia TLR ha atraído particular atención en varias enfermedades inflamatorias, incluyendo patologías del SNC (Lemaitre *et al.*, 1996; Buchanan *et al.*, 2010). Tanto con la inhibición farmacológica de TLR4 como con el uso de los ratones transgénicos que carecen del receptor TLR4 podemos observar una neuroprotección en condiciones de ACV experimental (Caso *et al.*, 2007; Hyakkoku *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2012) y TBI (Ahmad *et al.*, 2013). Por lo tanto, encontrar tratamientos para disminuir o modular la activación de TLR4 o la de sus ligandos sería terapéuticamente ventajoso en situaciones de TBI.

En el caso del TBI, se ha descrito en estudios previos la idea de que podría haber una sobreexpresión y liberación de la proteína galectina-3 al espacio extracelular, ya que se ha demostrado un aumento en los niveles en plasma de esta proteína después de TBI (Shan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016). Curiosamente, en uno de estos estudios, los autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de galectina-3 en plasma humano y el puntaje de la Escala de Coma de Glasgow (GCS, *Glasgow Coma Scale*) (Shen *et al.*, 2016), en el cual se realiza una exploración y cuantificación de tres parámetros tras el traumatismo: la apertura ocular, la respuesta verbal y la respuesta motora.

Nuestro grupo ha demostrado que esta galectina-3 liberada al espacio extracelular actúa como ligando paracrino endógeno del receptor TLR4, pudiendo inducir la activación microglial mediada por este receptor y con ello la respuesta inflamatoria en el SNC (Burguillos *et al.*, 2015).

Todos estos datos hacen pensar en la galectina-3 como posible diana terapéutica para reducir la activación del receptor TLR4 en pacientes con TBI y, con ello, reducir la progresión de los daños neuronales producidos por la neuroinflamación desencadenada por el daño inicial del traumatismo.

### 3.2. IMPLICACIÓN POTENCIAL DE LA GALECTINA-3 EN TBI

Muchos de los esfuerzos actuales para reducir el daño neuronal después de un TBI se centran en los procesos que regulan la respuesta neuroinflamatoria y la pérdida celular asociada que se produce durante la fase secundaria de la lesión (Hellewell *et al.*, 2016). Aunque está bien establecido que el proceso neuroinflamatorio juega un papel importante durante la progresión de la lesión en el TBI, todavía no está claro cómo modularla de manera que proporcione resultados beneficiosos (Kumar *et al.*, 2012; Hellewell *et al.*, 2016). Estudios recientes sobre la respuesta inflamatoria desencadenada por el TBI demuestran que la microglía/macrófagos muestran un fenotipo mixto como resultado del complejo entorno de señalización en lugar de un fenotipo bien definido (Kim *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Morganti *et al.*, 2016). Se ha demostrado que diversas terapias para tratar el TBI en modelos animales experimentales son eficaces cuando se dosifican antes o poco después del daño (Bergold, 2016), resaltando la importancia de los procesos desencadenados poco después de una lesión craneal para la progresión del daño neuronal asociado al TBI.

En este contexto, la microglía se presenta como la responsable de la respuesta inmune desencadenada tras el TBI y con ello de la liberación de compuestos proinflamatorios y citotóxicos que produce la progresión de la neurodegeneración asociada al daño inicial traumático (Kumar *et al.*, 2012; Hellewell *et al.*, 2016). Esta respuesta inflamatoria parece estar relacionada con la activación del receptor TLR4. Por otro lado, la galectina-3 es una proteína relacionada con una importante función en la modulación de la respuesta inmune y en la activación de la microglía en el SNC, cuya expresión aumenta en este tipo de células ante estímulos proinflamatorios (Li *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010; Burguillos *et al.*, 2015), y es secretada de forma temprana al espacio extracelular por estas células en diferentes modelos de TBI (Natale *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2010). Recientemente, se ha observado la capacidad de la proteína galectina-3 liberada de actuar como alarmina e inducir *per se* una respuesta inflamatoria en el SNC mediante su unión con el receptor TLR4 (Burguillos *et al.*, 2015), implicado en la respuesta inmune desencadenada tras el TBI (Park *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013; Hayward *et al.*, 2014; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Además, como ya se ha comentado, la galectina-3 secretada actúa como una opsonina uniéndose al receptor microglial fagocítico MerTK (Nomura *et al.*, 2017), estimulando la fagocitosis de neuronas vivas (Fricker *et al.*, 2012; Neher *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2016) y, pudiendo con ello, favorecer la progresión de la neurodegeneración.

Por todo ello, la galectina-3 podría tener un papel central en la regulación de la respuesta inmune cerebral desencadenada poco después de un TBI, y en etapas posteriores a la lesión (Didangelos *et al.*, 2016), la cual está asociada a la progresión de la neurodegeneración tras el TBI. Esta capacidad convierte a la galectina-3 en un importante objetivo de estudio y futura diana terapéutica en el terreno del TBI.



## OBJETIVOS / AIMS



La neuroinflamación ha sido fuertemente asociada a la progresión y etiología de numerosos procesos neurodegenerativos como son la Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer. Nuestro grupo lleva años estudiando los mecanismos de degeneración neuronal asociados a la neuroinflamación y activación microglial. Entre los principales inmunomoduladores se encuentra la galectina-3, la cual se encuentra fuertemente expresada en la microglía reactiva.

Una de las características más importantes de un daño cerebral traumático es la presencia de una gran respuesta inflamatoria cerebral. Es conocido que la lesión inicial generada por el traumatismo directo genera una respuesta inmune la cual juega un papel fundamental en el desarrollo y en la progresión de la neurodegeneración producida tras el TBI.

Por este motivo la regulación de la acción de la galectina-3 en este tipo de procesos se presenta como una posible diana terapéutica y una eficaz herramienta farmacológica para detener, o al menos retrasar, la progresión de la neurodegeneración asociada a la neuroinflamación desencadenada tras el TBI.

Los objetivos de este proyecto son:

- 1. Determinar si la galectina-3 se induce en nuestro modelo de TBI y en caso de inducción determinar el fenotipo celular.**
  - a. Para ello se utilizará un modelo de TBI en ratones inducido por impacto cortical controlado en el hemisferio derecho.
  - b. Se combinarán técnicas histológicas con técnicas de biología molecular para determinar la inducción en la expresión de la galectina-3 y que tipo celular es el principal responsable de ella.

- 2. Determinar si la galectina-3 se libera al espacio extracelular tras el TBI y con ello si es capaz de interaccionar con el receptor TLR4.** Mediante técnicas de inmunohistoquímica, ELISA, inmunoprecipitación e *immunoblotting*.
- 3. Determinar el papel de la galectina-3 en la neurodegeneración a corto y a largo plazo tras el TBI, y en la respuesta inmune cerebral asociada.**
  - a. Para ello, inicialmente se comprobará que nuestro modelo de TBI induce un proceso neurodegenerativo e inflamatorio en el cerebro a través de la valoración de diversos marcadores. Así mismo, se combinarán técnicas histológicas con técnicas de biología molecular para determinar la producción de citoquinas inflamatorias, la activación microglial y la pérdida neuronal.
  - b. Para discernir entre el papel de la galectina-3 a nivel intracelular y extracelular el estudio se hará utilizando ratones transgénicos con ausencia del gen de la galectina-3 (ratones KOGal3), los cuales carecen totalmente de la proteína, y utilizando animales silvestres (ratones WT) y ratones WT a los que se les administra, en la zona cortical dañada por el traumatismo, anticuerpos de neutralización contra la proteína galectina-3 liberada (ratones Ac-Gal3).

Todo ello, se analizará tanto en la corteza, estructura afectada directamente por el impacto, como en el hipocampo, estructura especialmente sensible a un daño cortical traumático, en especial las neuronas de la capa piramidal.

Neuroinflammation has been closely associated with the progression and etiology of numerous neurodegenerative processes such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Our group has spent years studying the mechanisms of neuronal degeneration associated with neuroinflammation and microglial activation. Galectin-3 is one of the main immunomodulators, which is strongly expressed by reactive microglia.

One of the most important features of a traumatic brain injury is the presence of a large inflammatory brain response. It is known that the initial injury generated by direct trauma generates an immune response, which plays a fundamental role in the development and progression of the TBI-associated neurodegeneration.

For this reason, the regulation of the action of galectin-3 in this type of process is presented as a possible therapeutic target and a useful pharmacological tool to stop, or at least delay, the progression of neurodegeneration associated with neuroinflammation triggered by the TBI.

The aims of this project are:

- 1. To determine whether galectin-3 is induced in our TBI model and, in case of induction, to determine the cellular phenotype.**
  - a. For this, a TBI model in mice induced by controlled cortical impact in the right hemisphere will be used.
  - b. Histological and molecular biology techniques will be combined to determine the induction of galectin-3 mRNA and protein expression and to identify the main cellular phenotype responsible for that.

2. **Ability of galectin-3 to be released into the extracellular space in response to TBI and whether it is able of interacting with the TLR4 receptor.** It will be analysed by immunohistochemistry, ELISA, immunoprecipitation and immunoblotting.
3. **Role of galectin-3 in short and long-term neurodegeneration after TBI, and associated cerebral immune response.**
  - a. For this, we will initially check that our TBI model induces a neurodegenerative and inflammatory process in the brain through the assessment of various markers. Likewise, histological and molecular biology techniques will be combined to determine the production of inflammatory cytokines, microglial activation and neuronal loss.
  - b. In order to distinguish between the role of galectin-3 at the intracellular level and the extracellular level, transgenic mice with absence of the galectin-3 gene (KOGal3 mice) and hence totally lacking this protein, and wild type animals (WT mice) will be used in this study. Besides, we will analyse the effect of neutralizing extracellular galectin-3 *in vivo* in WT mice subjected to TBI.

The analysis will be carried out both in the cortex, which is directly affected by the impact, and in the hippocampus, a sensitive structure to traumatic cortical damage, especially the neurons of the pyramidal cell layers.

# MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. CULTIVOS CELULARES

### 1.1. CULTIVO DE LÍNEA CELULAR

La manipulación del cultivo se realizó dentro de una campana de flujo laminar. La línea celular murina microglial BV2 (pase < 30) se mantuvieron en un medio de cultivo DMEM con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina y estreptomicina (P/S). El porcentaje de FBS se redujo al 2-5% durante el desarrollo del experimento. Las células se mantuvieron en un incubador celular a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2. CULTIVO PRIMARIO DE CEREBRO

Los cultivos primarios de cerebro se prepararon a partir de rata Wistar postnatales de 5-7 días de edad. Las crías fueron sacrificadas por decapitación.

La manipulación del cultivo se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Con la ayuda de unas pinzas y un bisturí de cirugía, se realizó una incisión en la línea media para exponer el cráneo. Luego, con unas tijeras de cirugía se hizo un corte longitudinal en el cráneo, separando ambos hemisferios. Con las pinzas se eliminó el cráneo quedando expuesto el cerebro, listo para ser extraído con las pinzas. Estos cerebros se conservaron en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) fría y con un 1% de P/S en placas de petri.

La disección de las cortezas o cerebelos se realizó eliminando el mesencéfalo con un bisturí y las meninges con la ayuda de unas pinzas de disección y una lupa *Microscope LED2000*.

### 1.2.1. CULTIVO PRIMARIO DE MICROGLÍA

Las cortezas limpias de meninges se cortaron en trocitos pequeños con un bisturí y se transfirieron a un tubo de 50 ml con 10 ml de HBSS con 1% de P/S y 0,1% de tripsina, precalentado a 37 °C para activar la enzima. Este tubo se mantuvo durante 15 minutos en el incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esto, quedó un precipitado de tejido y un sobrenadante, el cual se eliminó mediante pipeteo con una pipeta serológica de 5 ml. Justo después, y para inactivar la enzima, se añadieron 20 ml de DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de P/S, y se inició la disgregación mecánica del tejido mediante una serie de pipeteos (20 pipeteos con pipeta serológica de 10 ml, 20 pipeteos con pipeta serológica de 5 ml y 20 pipeteos con pipeta P1000). Entre cada tanda de 20 pipeteos se dejó reposar la suspensión celular 1 minuto, y tras esto, se recogió la mitad del sobrenadante (suspensión celular) y se transfirió a través de un filtro de 40 µm a un nuevo tubo de 50 ml. El tejido precipitado durante ese minuto se pipeteó y disgregó de nuevo. Una vez recogidos los 3 sobrenadantes, productos de la disgregación mecánica de cada tanda de pipeteos, se centrifugaron a 150xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en DMEM suplementado (10 ml de DMEM/3 crías). La suspensión celular se sembró en frascos T75 (10 ml/frasco) pretratados durante 30 minutos con 0,0005% de poli-L-lisina en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y luego lavados con agua estéril y con PBS.

A las 24 horas se realizó un leve golpeo de los frascos para levantar todos los restos celulares adheridos a la superficie del frasco, con el objetivo de dejar adheridas solo las células vivas. Tras esto, se cambiaron los 10 ml de medio de cultivo por 25 ml de medio nuevo. A los 7-10 días, se aisló la microglía de la monocapa de astrocitos por

levantamiento de la microglía mediante agitación y golpeo del frasco T75. Esta microglía en suspensión se recogió en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 150xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizó el recuento celular y se sembraron en placa de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/500  $\mu$ l de DMEM suplementado/pocillo) previamente pretratada como se ha descrito anteriormente. Después de 12 o 24 horas, las células estuvieron listas para su estudio o experimentación.

### 1.2.2. CULTIVO PRIMARIO MIXTO GLIAL

Los cerebelos limpios de meninges se cortaron en trocitos pequeños con un bisturí y se transfirieron a un tubo de 50 ml con 10 ml de *Versene* precalentado a 37 °C para activar la enzima. Este tubo se mantuvo durante 5 minutos en el incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esto, quedó un precipitado de tejido y un sobrenadante, el cual se eliminó mediante pipeteo con una pipeta serológica de 5 ml. Justo después, y para inactivar la enzima, se añadieron 20 ml de DMEM suplementado con 5% de FBS, 5% de suero de caballo (HS), 5 mM de HEPES, 20 mM de KCl, 2 mM de L-Glutamina, 13 mM de Glucosa y 1% de P/S, y se inició la disgregación mecánica del tejido mediante una serie de pipeteos (20 pipeteos con pipeta serológica de 10 ml, 20 pipeteos con pipeta serológica de 5 ml y 20 pipeteos con pipeta P1000). Entre cada tanda de 20 pipeteos, se dejó reposar 1 minuto la suspensión celular y tras esto se recogió la mitad del sobrenadante (suspensión celular) y se transfirió a través de un filtro de 40  $\mu$ m a un nuevo tubo de 50 ml. El tejido precipitado durante ese minuto se pipeteó y disgregó de nuevo. Una vez recogido los 3 sobrenadantes, productos de la disgregación mecánica de cada tanda de pipeteos, se centrifugaron a 150xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se

eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en DMEM suplementado. Se realizó el recuento celular y se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en una placa de 24 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/500 µl de DMEM suplementado/pocillo) pretratada durante 30 minutos con 0,001% de poli-L-lisina en PBS, y luego lavados con agua estéril y con PBS.

A las 24 horas se realizó un cambio total del medio de cultivo. A los 7-10 días, las células estuvieron listas para su estudio o experimentación. De todo el cultivo mixto, aproximadamente el  $85 \pm 5\%$  eran neuronas,  $7 \pm 3\%$  astrocitos y  $5 \pm 3\%$  microglía.

### 1.3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizaron los cultivos primarios mixtos gliales, en los cuales se realizó el recuento de las neuronas vivas comparando los cultivos tratados con galectina-3 recombinante (1 µM) durante 96 horas con los cultivos controles. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el recuento celular, el cultivo se incubó con Hoechst (5 µg/ml) para marcar los núcleos celulares, yoduro de propidio (1 µg/ml) para identificar las células necróticas y Alexa-488 unido a isolectina-B4 (1 µg/ml) para identificar la microglía. Las neuronas sanas o apoptóticas se reconocieron por las diferencias en la morfología del núcleo (cromatina condensada), mientras que las células positivas a yoduro de propidio (indicando permeabilidad de membrana) se identificaron como necróticas.

La densidad celular se evaluó usando un microscopio *Leica DMI6000 CS* y cuantificando manualmente el número de células vivas en 4 campos por pocillo elegidos aleatoriamente (contadas alrededor de 150-200 neuronas por campo en la condición control).

#### 1.4. PREPARACIÓN DE RESTOS NEURONALES Y SU MARCAJE

Para la elaboración de restos neuronales se utilizaron las células de la línea neuronal PC12.

Los cultivos se lavaron con PBS para eliminar el medio de cultivo y se tiñeron con 50  $\mu$ M de tetrametilrodamina (TAMRA) durante 10 minutos. Luego, se lavaron con PBS dos veces para eliminar el posible TAMRA libre, y por último se añadieron 100  $\mu$ l de PBS por pocillo. Con una punta de pipeta P100, se raspó la superficie del pocillo para despegar las células de la placa de 24 pocillos. Con ayuda de una jeringa, la suspensión celular de cada pocillo se recogió en un tubo de 15 ml haciéndola pasar 10 veces por una aguja 27G, rompiéndose así las células. Todo este proceso se realizó en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia del TAMRA.

La concentración de restos neuronales se midió mediante la cuantificación de proteína utilizando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible*.

#### 1.5. ENSAYO DE FAGOCITOSIS

Para el ensayo de fagocitosis microglial de restos de neuronas se utilizaron los cultivos de la línea microglial BV2 y los restos neuronales de la línea neuronal PC12. La cuantificación de la fagocitosis de restos neuronales se realizó mediante citometría de flujo, comparando los cultivos tratados con galectina-3 recombinante (200nM) durante 18 horas con los cultivos controles.

Ambos cultivos se incubaron con restos neuronales (60  $\mu$ g/ml) durante 2 horas. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células microgliales BV2 se mantuvieron en DMEM suplementado con 0,5% de FBS y en aproximadamente el 60% de confluencia cuando se añadieron los restos neuronales.

Para el análisis por citometría de flujo, se tiñeron las células BV2 con Alexa-488 unido a isolectina-B4 (1 µg/ml) durante 15 minutos, para identificar a la microglía. Después se lavó el cultivo con PBS para eliminar los restos neuronales no fagocitados y se realizó una breve tripsinización (tripsina 1% en PBS durante 5 min) para separar las células. Después de estos 5 minutos, se añadió DMEM para neutralizar la enzima y se centrifugaron las células a 150xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar toda la tripsina. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 200 µl de PBS frío.

#### **1.6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

La capacidad fagocítica microglial de restos neuronales se cuantificó mediante citometría de flujo con el aparato *BD Accuri™ C6 Plus* y se representó como la fluorescencia media del TAMRA (canal FL2) por célula Alexa-488 positiva (canal FL1). Se analizaron 10000 células por condición en cada experimento independiente.

## 2. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Todos los experimentos realizados en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla se llevaron a cabo de acuerdo con el documento «*Guidelines of the European Union Council*» (86/609/EU), siguiendo las regulaciones españolas (BOE 34/11370-421, 2013) para el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por el comité ético científico de la Universidad de Sevilla.

Para todos los experimentos se utilizaron ratones de 10-12 semanas de edad. Los experimentos se realizaron utilizando dos tipos de ratones, los ratones silvestres (ratones WT) y los mutantes con ausencia de galectina-3 (ratones KOGal3). Estos ratones WT y KOGal3 no se generaron en la misma camada, pero pertenecen a la misma cepa C57BL/6. Los ratones KOGal3 fueron suministrados por el Dr. Tomas Deierborg de la Universidad de Lund (Suecia). También se utilizaron ratones de 10-12 semanas de edad CD-1 (IRC) suministrados por *Charles River Laboratories*.

Los ratones se mantuvieron a una temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C y a una humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y acceso libre a comida y agua.

### 2.1. IMPACTO CORTICAL CONTROLADO

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (*KETAMIDOR*® 50 mg/kg) y dexmedetomidina (*DEXDOMITOR*® 10 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) y analgesia preventiva con buprenorfina (*BUPREKARE* 0,05 mg/kg) por vía subcutánea (s.c.). Una vez que se confirmó la anestesia, los ratones se colocaron en un marco

estereotáxico donde se realizó la trepanación craneal, asegurados con una barra de sujeción para los dientes y orejas.

Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras pequeñas de cirugía, se realizó una incisión en la línea media para exponer el cráneo. Después, se hizo una craneotomía de 3 mm sobre el hueso parietal derecho (el punto central estaba en -2,0 mm bregma y 2,5 mm lateral) usando un taladro dental de mano con una punta de 0,5 mm de diámetro. Se aseguró que la duramadre no se alterara durante la perforación, ni se perdiera el fragmento del cráneo. El daño cerebral traumático (TBI) se llevó a cabo realizando un impacto cortical controlado (ICC) utilizando el impactador cortical de precisión *PinPoint™ PCI3000 Precision Cortical Impactor™*. Los parámetros utilizados fueron: velocidad de 3,0 m/s, tiempo de permanencia de 100 ms y profundidad de impacto de 2,2 mm a un ángulo de 20°. Después del impacto cortical, se recolocó el fragmento óseo del cráneo, se suturó la piel y se colocaron los animales en una incubadora 1 hora a 27-28 °C. A los ratones controles se les realizó solamente la craneotomía.

Aproximadamente 40 minutos después de la última dosis de anestésico, a los ratones se les administró Antipamezol (*ANTISEDAN®* 2 mg/kg, s.c.) y suero fisiológico (100 ml/kg, s.c.) para revertir el efecto anestésico y prevenir la deshidratación. La atención postoperatoria consistió en el control diario del peso y la administración de buprenorfina 2 veces al día (*BUPRECARE* 0,05 mg/kg) hasta que hubo ganancia de peso.

## 2.2. ADMINISTRACIÓN INTRACRANEAL

En un segundo estudio, realizado en los ratones de la cepa CD-1, se administraron por vía intracraneal (i.c) anticuerpos en el epicentro de la lesión 1 hora después del TBI. Diez minutos antes de la inyección i.c., se proporcionó una recarga de



anestesia para asegurar que los ratones estuvieran completamente anestesiados. Para la administración i.c. se utilizó una jeringa *Hamilton* con un volumen final de 5  $\mu$ l. Se administraron dos anticuerpos diferentes a una concentración de 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l y a una velocidad de 1  $\mu$ l/min durante 5 minutos: un anticuerpo control de isotipo IgG (Ac-IgG) o un anticuerpo de neutralización de galectina-3 (Ac-Gal3). Después de la administración i.c, la jeringa se retiró lentamente para evitar el reflujo del volumen administrado, se recolocó el fragmento óseo del cráneo, se suturó la piel y se colocaron los animales en una incubadora 1 hora a 27-28 °C.

Aproximadamente 40 minutos después de la última dosis de anestésico, a los ratones se les administró Antipamezol (*ANTISEDAN*® 2 mg/kg, s.c.) y suero fisiológico (100 ml/kg, s.c.) para revertir el efecto anestésico y prevenir la deshidratación. La atención postoperatoria consistió en el control diario del peso y la administración de buprenorfina 2 veces al día (BUPRECARE 0,05 mg/kg) hasta que hubo ganancia de peso.

### 2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PERFUSIÓN INTRACARDIACA

Los ratones se anestesiaron profundamente con una mezcla de ketamina (*KETAMIDOR*® 50 mg/kg) y dexmedetomidina (*DEXDOMITOR*® 10 mg/kg) por vía i.p. y analgesia preventiva con buprenorfina (BUPRECARE 0,05 mg/kg) por vía s.c. Una vez que se confirmó la anestesia, los ratones se fijaron a una superficie y se procedió a la extracción de las muestras.

Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras pequeñas de cirugía, se realizó una incisión en la línea media para exponer el cráneo. Las muestras de LCR se obtuvieron de la cisterna magna de los ratones utilizando una jeringa de insulina. Se obtuvieron aproximadamente 5  $\mu$ l de LCR por ratón, que se almacenaron en microtubos de 0,2 ml

que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C para su posterior análisis.

Tras la recogida del LCR, se procedió a la realización de la perfusión intracardiaca. Para ello se abrió la caja torácica del ratón con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras de cirugía, exponiendo el corazón con la ayuda de pinzas hemostáticas. Esta perfusión se realizó introduciendo una aguja 22G por el ventrículo izquierdo, la cual estaba conectada a una bomba de perfusión. Sobre la aurícula derecha se realizó un corte para facilitar la salida del líquido de perfusión introducido por el ventrículo izquierdo.

A los ratones cuyos cerebros se usaron para la extracción de ARN o proteínas se les realizó una perfusión intracardiaca con PBS frío. Con unas tijeras de cirugía, se realizó un corte longitudinal en el cráneo, separando ambos hemisferios. Con las pinzas, se eliminó el cráneo quedándose expuesto el cerebro, listo para ser extraído con las pinzas. Con unas pinzas de disección, se separaron el hipocampo y la corteza, y se almacenaron en microtubos de 2 ml que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C para su posterior análisis.

A los ratones cuyos cerebros fueron destinados para ser analizados por inmunohistoquímica, se les realizó una perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) frío al 4%. Los cerebros se extrajeron y transfirieron a una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que se hundieron, para luego ser congelados a -80 °C.

### 3. GENOTIPADO

#### 3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Los ratones con 2 semanas de edad se enumeraron mediante un código a través del corte con tijera de sus falanges (Figura 6). Las tijeras se lavaron y esterilizaron con etanol, y se limpiaron con etanol tras su uso para evitar contaminación de ADN entre las muestras de un ratón y otro.

Las falanges de cada ratón se almacenaron en microtubos de 0,2 ml y se les añadieron 50  $\mu$ l del kit de extracción de ADN *QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0*. Se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Este protocolo consiste en una agitación de la muestra con vortex de 15 segundos, una incubación de 15 minutos

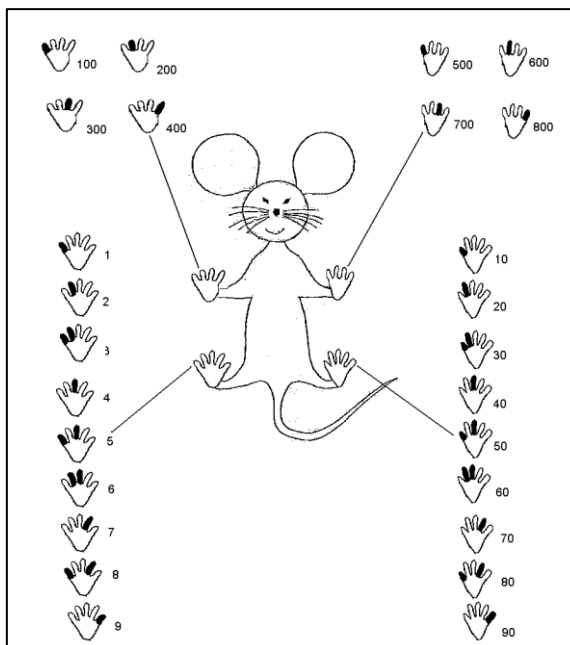


Figura 6. Sistema de enumeración e identificación de ratones.

a 65 °C, otra agitación con vortex de 15 segundos y, por último, una incubación de 2 minutos a 98 °C. Las incubaciones se realizaron en un termociclador *PTC-100 Thermal Cycler*. El ADN extraído en los 50  $\mu$ l del reactivo se utilizó directamente para el genotipado o se congeló a -80 °C.

#### 3.2. PCR CONVENCIONAL. ANÁLISIS DEL ADN

El genotipado de los ratones WT y KOGal3 se realizó mediante PCR convencional (PCR) del ADN extraído de las falanges. Para ello, se utilizó el kit de PCR *MyTaq™ Red DNA Polymerase* y unos cebadores (Tabla 12) a una concentración de 10  $\mu$ M (stock a

100  $\mu\text{M}$  en agua para biología molecular). Se siguió el protocolo definido por el fabricante, en el cual se utiliza 10  $\mu\text{l}$  de 5x *MyTaq Red Reaction Buffer*, 0,5  $\mu\text{l}$  de *MyTaq Red ADN polymerase*, 1  $\mu\text{l}$  de la muestra de ADN extraído, 2  $\mu\text{l}$  de cebadores a 10  $\mu\text{M}$  (2  $\mu\text{l}$ /cebadores) y 32,5  $\mu\text{l}$  de agua para biología molecular (cantidad suficiente para completar 50  $\mu\text{l}$  de mezcla total). La PCR se realizó utilizando un termociclador *PTC-100 Thermal Cycler* y siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Este protocolo consiste en un paso inicial de 1 minuto a 94 °C y luego, 35 ciclos de una primera fase de desnaturalización de 15 segundos a 95 °C, una segunda fase de hibridación de 15 segundos a 58 °C y una tercera y última fase de extensión de 10 minutos a 72 °C.

Las diferentes muestras de ADN amplificado en la PCR se cargaron en los diferentes pocillos de un gel de agarosa al 2% en buffer tris base/ácido acético/EDTA (TAE) para su visualización e identificación. Este gel se situó en una cubeta de electroforesis llena de buffer TAE y conectada a una fuente de corriente de baja tensión. Al gel se le añadió el intercalante del ADN *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* que permitió visualizar por fluorescencia las diferentes bandas de ADN en el gel, separadas según el peso molecular o pares de bases (pb). En uno de los pocillos del gel se cargó el marcador de peso molecular *DNA gTP-Ladder*, que ayudó a identificar las diferentes bandas de ADN.

Estas diferentes bandas se visualizaron en un lector de geles *Lector FLA5100*, donde pudimos identificar 2 bandas diferentes que corresponden al ADN amplificado por los cebadores common/WT (300 pb, indica que el ratón tiene el gen galectina-3) y cebadores common/mutant (384 pb, indica que el ratón no tiene el gen galectina-3). Las muestras que contenían las 2 bandas identificadas proceden de ratones heterocigotos.

#### 4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARN MANSAJERO (ARNm)

##### 4.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN de ratón se utilizaron las muestras de la corteza y el hipocampo congeladas en microtubos de 2 ml. La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo *TRIstore™* y siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Todo el procedimiento se llevó a cabo en campana de gases *Ductless Fume Hood CRUMA 870*.

Se añadió 1 ml de TRIstore y 12 perlas de vidrio a cada muestra contenida en microtubos de 2 ml. Los microtubos se acoplaron en un aparato lisador de tejido *TissueLyser II*, donde la combinación de las perlas de vidrio con el movimiento del aparato produjo la rotura, disgregación del tejido y la consiguiente liberación del contenido intracelular. Una vez disgregado el tejido, se transfirió todo el contenido a otro microtubo de 1,5 ml y se añadieron 200 µl de cloroformo. Se realizó una fuerte agitación durante 15 segundos, se dejaron reposar las muestras 5 minutos y se centrifugaron a 12000xg durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, el contenido de cada muestra estaba separado en 3 fases (primera, fase acuosa con ARN; segunda, interfase con ADN; y última, fase con las proteínas). Con cuidado, sin coger parte de la interfase, se retiró únicamente la fase acuosa con el ARN y se transfirió a otro microtubo de 1,5 ml junto con 500 µl de isopropanol frío. Se realizó una fuerte agitación durante 15 segundos, se dejaron reposar las muestras 10 minutos para que precipitara el ARN. Luego, se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de cada muestra estaba separado en el precipitado de ARN y el sobrenadante, que se retiró. El precipitado de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% y, tras una agitación en vortex, las muestras se centrifugaron a 7500xg durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró

de nuevo y el precipitado se dejó secar 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua para biología molecular y se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 ml.

La muestra de ARN aislado se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers*.

#### 4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN

Para realizar la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit de retrotranscripción *RevertAid™ First Str cDNA Synthesis kit*, y siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

En este protocolo se utiliza 1 µg de ARN de cada muestra, que se transfirieron a un microtubo de 0,2 ml donde se fue añadiendo la mezcla de reactivos del kit: 1 µl de *Random hexamer primer*, 4 µl de *5x Reaction Buffer*, 1 µl de *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µL), 2 µl de 10 mM dNTP Mix y 1 µl de *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/µL). El resto del protocolo se realizó en un termociclador *PTC-100 Thermal Cycler* siguiendo el programa establecido por el fabricante que consiste en una primera incubación de 5 minutos a 25 °C, otra de 60 minutos a 42 °C, y una última de 5 minutos a 70 °C.

El ADNc obtenido en los 20 µl totales de la reacción se utilizó directamente para el estudio de expresión génica o se congeló a -80 °C.

#### 4.3. PCR A TIEMPO REAL. ANÁLISIS DEL ARNm

Para la realización del análisis de expresión génica o niveles de ARNm se llevó a cabo una PCR a tiempo real (RT-PCR). Se utilizó un kit de PCR *SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit* y se siguió el protocolo establecido por el fabricante.

Se utilizaron 42 ng de ADNc (4,2 µl) de cada muestra, los cuales se transfirieron a una placa de 384 pocillos *LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 White* con la pipeta automática *E1-ClipTip™ Bluetooth™ Electronic Multichannel Pipettes*. Se añadió por muestra 5 µl de 2x *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* y 0,4 µl de cada cebador (Tabla 13). De cada muestra se realizó un triplicado. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador *LightCycler® 480*. El programa utilizado comenzó con un primer ciclo de 2 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos consistentes en una fase de desnaturalización de 5 segundos a 95 °C, una segunda fase de hibridación de 10 segundos a 65 °C y una tercera y última fase de extensión de 20 segundos a 72 °C. El programa terminó con un paso final de 7 minutos a 72°C.

Se determinó el ciclo en el que cada muestra superó el umbral de fluorescencia (valor Ct) y se hizo la media de los valores obtenidos en los triplicados de cada muestra. Se utilizó como gen referencia la expresión de  $\beta$ actina, dato con el cual se normalizaron el resto de los resultados.

## 5. ELISA

La cuantificación de la galectina-3 liberada en el LCR se analizó mediante la técnica ELISA usando un Kit de cuantificación de galectina-3 *BGM Galectin-3® Galectin-3 Assay*. Se siguió el protocolo establecido por el fabricante.

Se reconstituyeron y se diluyeron los reactivos como el *galectin-3 Standard* (S1), los controles (C1 y C2) y las muestras 1:10 con *Assay Buffer* (AB). El estándar se diluyó mediante diluciones seriadas con AB para usarlos en la recta patrón. Se procedió a cargar la placa con 100 µl por pocillo de estándar, controles, blancos y muestras. Se cubrió con papel de aluminio la placa y se incubó 1 hora a 20-25 °C. Con la ayuda de una pipeta multicanal, se vació la placa y se lavó 4 veces con 300 µl *wash buffer* (WB) por pocillo. Se diluyó el *Tracer Concentrate* 1:30 con AB, y se añadió 100 µl a cada pocillo. Se cubrió con papel aluminio la placa y se incubó 1 hora a 20-25 °C. Se vació la placa y se lavó con WB siguiendo el mismo procedimiento. Se añadieron 100 µl de *TMB substrate* a cada pocillo y se incubó la placa 20 minutos a 20-25 °C en oscuridad. Se eliminaron las burbujitas que pudieran quedar y se procedió a leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas *Synergy HT Multi-Mode Reader*.



## 6. INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

La interacción física entre la galectina-3 y el receptor de membrana TLR4 se determinó mediante inmunoprecipitación de una muestra de 2,5 mg de proteínas procedente de tejido cerebral siguiendo el método descrito en Burguillos *et al.*, 2015.

Las células se lisaron con un homogeneizador de ultrasonidos *Sonoplus HD2200* con un pulso de 30 segundos de sonicación. Las proteínas se sedimentaron por centrifugación en un tampón formado por Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, 1  $\mu$ M p-hidrocloreuro de fluoruro de amidinofenilmetanosulfonilo, NaF 50 mM y glicerol al 10% (pH 7,5).

La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando el kit de inmunoprecipitación *Dynabeads™ Protein Immunoprecipitation Kit* basado en la unión de las bolitas magnéticas *Dynabeads™ Magnetic Beads* al anticuerpo de interés (anticuerpo anti-TLR4), y este a la proteína TLR4, pudiendo así aislarla utilizando un imán *DynaMag™-2 Magnet*.

El protocolo seguido fue el establecido por el fabricante y se inició con la preparación de la suspensión de *Dynabeads* en microtubos de 1,5 ml. Una vez preparadas, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (en rotación) con 2,5  $\mu$ l de anticuerpo anti-TLR4 o anti-IgG (control negativo) contenido en 200  $\mu$ l de *Ab Binding&Washing Buffer*. Los microtubos se pusieron en el imán, precipitaron las *Dynabeads* y se eliminó el sobrenadante. Se añadió la muestra de proteínas (también llamado antígeno, Ag) (100-1000  $\mu$ l) al complejo formado por las *Dynabeads*-anticuerpo (Ac) y se resuspendió mediante pipeteo suave. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (en rotación). Las muestras se pusieron de nuevo sobre el imán, precipitó el complejo formado por *Dynabeads*-Ac-Ag y se eliminó el sobrenadante. Este

precipitado se lavó 3 veces con 200 µl de *Washing Buffer* (WB) mediante pipeteo suave. Por último, se resuspendió el complejo en 100 µl de WB y se transfirió a otro nuevo microtubo, el cual se depositó de nuevo en el imán y se volvió a eliminar el sobrenadante. Para separar las *Dynabeads*-Ac del Ag se resuspendió suavemente el complejo en 20 µl de *Elution Buffer*, se añadieron 10 µl de SDS 1% y se incubó durante 10 minutos a 70 °C. Las muestras se pusieron de nuevo sobre el imán y se recogió el sobrenadante, que contenía las proteínas, dejando un precipitado formado por las *Dynabeads*-Ac. El SDS 1% se complementó con inhibidores de fosfatasa *PhosSTOP™* y de proteasas *Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA Free*.

## 7. IMMUNOBLOTTING (IB)

Todas las muestras de la inmunoprecipitación se procesaron para *immunoblotting* (IB) con una electroforesis en gel SDS-PAGE. La cantidad de proteína se cuantificó mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible* para luego poder cargar en cada pocillo del gel 30 µg de proteína de cada muestra. Además, se cargó en el gel el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards* para poder identificar las diferentes bandas de proteínas.

Tras la cuantificación, se mezcló la muestra en proporción 1:1 con el buffer de carga *2x Laemmli Sample Buffer* para facilitar la carga y visualización de las proteínas a lo largo del gel. Esta mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min. Para la electroforesis se utilizaron geles de electroforesis *12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels* y un buffer de electroforesis tris base/glicina/SDS (TGS). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 V durante 1 hora.

Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs* mediante el sistema automático de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems*.

Para evitar uniones inespecíficas al antígeno la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en solución salina tamponada con Tris (TBS) con 0.05% de Tween-20 (TBS-T), 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 3% de caseína, y en agitación (*Shaker*). Tras el bloqueo, se realizaron 3 lavados en agitación de 10 minutos con TBS-T. Después, se inició la incubación y marcaje de los anticuerpos primarios (Tabla 10) durante 12 horas a 4 °C y en agitación, diluidos en TBS-T con BSA al 1%. Al día siguiente, se realizaron otros 3 lavados en agitación de 10 minutos con TBS-T. Se inició la incubación y marcaje de los anticuerpos secundarios (Tabla 11) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, diluidos en TBS-T con BSA al 1%. Por último, se realizaron otros 3 lavados en agitación de 10 minutos con TBS-T.

Para la estandarización de la carga de proteínas se utilizó un anticuerpo anti-IgG. Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia mediante el kit de revelado *Clarity Max™ Western ECL Substrate* siguiendo el protocolo del fabricante y en un lector de quimioluminiscencia *LAS-3000 MINI*.

## 8. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

### 8.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se realizaron cortes coronales del cerebro de los ratones de experimentación, entre Bregma + 0,50 a - 4,04, de un grosor de 20  $\mu\text{m}$  y a -20 °C, mediante el uso de un criostato *Leica CM 1850 UV*. Las dos regiones de estudio fueron la corteza y el hipocampo. Los cortes se almacenaron en solución anticongelante (20% agua destilada, 20% PBS2x, 30% etilenglicol, 30% glicerina) en placas de 24 pocillos a -40 °C. Todo el proceso se realizó en placas de 24 pocillos mediante la técnica de cortes flotantes en tubos con rejilla acoplados a los pocillos de la placa.

### 8.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes se lavaron 3 veces durante 10 minutos en agitación con PBS para eliminar la solución anticongelante. Después, se incubaron 30 minutos a 80 °C en citrato al 0,024%. Los cortes se lavaron 3 veces durante 10 minutos en agitación (*shaker*) con PBS y tras esto se inactivó la peroxidasa endógena con una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% en metanol durante 15 minutos en agitación. Luego, se incubaron durante 1 hora en agitación en PBS-Tritón al 1% (PBS-T1%). Se realizó el bloqueo con BSA al 5% (p/v) en PBS-T1% durante 2 horas en agitación. Las secciones se incubaron posteriormente con los anticuerpos primarios (Tabla 10) diluidos en una solución de BSA al 1% (p/v) en PBS-T1% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y después durante 12 horas a 4 °C. Al día siguiente, se incubaron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente para seguir con 6 lavados de 10 minutos en agitación con PBS-T0,1%. Luego, se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios biotinilados

(Tabla 11) diluidos en BSA al 1% (p/v) en PBS-T0,1% y se lavaron 6 veces los cortes durante 10 minutos con PBS-T0,1%. Luego, se incubó con el kit VECTASTAIN ABC HRP Kit durante 1 hora. Se lavaron los cortes 6 veces con PBS-T0,1% y se añadió diaminobencidina (DAB, 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 2 ml de diaminobencidina) hasta considerar que la reacción se habría llevado a cabo (2-5 minutos). Tras esto, se eliminó rápidamente la DAB y se lavaron las secciones con PBS.

Las secciones se montaron en los portaobjetos y se dejaron secar durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 1 minuto con agua destilada. Las secciones se deshidrataron a través de una serie de lavados de 2 minutos con una concentración creciente de etanol (70%, 96% (x2) y 99% (x3)) y 5 minutos con xileno al 100% (x3). Tras el último paso, se eliminaron los restos de xileno y se montaron los cubreobjetos usando medio de montaje DPX. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta observación en el escáner digital de secciones de tejido *NanoZoomer-XR Digital slide scanner*.

### 8.3. INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Los cortes se lavaron 3 veces durante 10 minutos en agitación con PBS para eliminar la solución de anticongelante. Después, se incubaron durante 30 minutos a 80°C en citrato al 0,024%. Los cortes se lavaron 3 veces durante 10 minutos en agitación (*shaker*) con PBS, y luego, se incubaron 1 hora en agitación en PBS-Tritón al 1% (PBS-T1%). Se realizó el bloqueo con BSA al 5% (p/v) en PBS-T1% durante 2 horas en agitación. Las secciones se incubaron posteriormente con los anticuerpos primarios (Tabla 10) diluidos en una solución de BSA al 1% (p/v) en PBS-T1% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y después durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se

incubaron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, para seguir con 6 lavados de 10 minutos en agitación con PBS-T0,1%. Luego, se incubaron 1 hora en agitación con los anticuerpos secundarios (Tabla 11) diluidos en BSA al 1% (p/v) en PBS-T0,1% y se lavaron 6 veces los cortes durante 10 minutos en agitación con PBS-T0,1%. Los cortes se incubaron con Hoechst 1:2000 en PBS-T0,1% durante 5 minutos en agitación, y tras esto, se realizaron los 3 últimos lavados con PBS-T0,1% durante 10 minutos en agitación.

Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia *Fluorescence Mounting Medium*, se colocaron los cubreobjetos y se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su observación en el microscopio confocal *ZEISS LSM 7 DUO*.

#### 8.4. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

La muerte neuronal y la neuroinflamación junto con la activación y respuesta microglial después del TBI se cuantificaron en la corteza y en las diferentes subregiones del hipocampo CA1 y giro dentado (GD).

El análisis cuantitativo de las células de interés se llevó a cabo realizando una evaluación manual usando un objetivo de 20x. Se utilizaron cuatro secciones cerebrales diferentes por animal en cuatro niveles diferentes de bregma (- 1,06 mm, - 1,46 mm, - 2,10 mm y - 2,46 mm). El conteo de células se expresó como el número total de células contadas por el área total de muestreo (número de células/mm<sup>2</sup>).

La cuantificación de las neuronas se realizó en base al número de células NeuN-positivas y la cuantificación de la microglía *Rod* (microglía de “varilla”) en base al número de células Iba1-positivas con procesos altamente polarizados y soma alargado (forma de

salchicha del inglés *sausage*). En el caso de la cuantificación de neuronas se utilizó una región de muestreo de 0,263 mm<sup>2</sup> en cada una de las cuatro secciones, mientras que para la cuantificación de la microglía *Rod* se utilizó una región de muestreo de 1,1 mm<sup>2</sup>.

El análisis morfológico de la microglía (células Iba1-positivas) se realizó utilizando el programa *ImageJ 1.50d* e incorporando un *plugin ImageJ "AnalyzeSkeleton"*. Con este plugin se realizó la cuantificación del número y longitud de las ramificaciones celulares. Se colocó un marco de 163 x 102 µm sobre diferentes áreas de interés en el hipocampo y se analizaron veinte células por marco.

## 9. TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

La cuantificación de la pérdida a largo plazo de tejido cortical se realizó mediante una tinción con azul de toluidina. Para ello se realizaron cortes coronales del cerebro de los ratones de experimentación, 21 días después del TBI, entre Bregma + 0,50 a – 4,04, mediante una cámara ocular digital acoplada a un microscopio de disección. Las secciones se coloraron en portaobjetos y se dejaron secar al aire.

Los portaobjetos (con las secciones) se enjuagaron sumergiéndolos en agua destilada primero y luego en una solución de 300 ml de Etanol al 70% con 5 ml de ácido acético 0,2 M durante 2 horas. A continuación, los portaobjetos se incubaron en una solución filtrada de azul de toluidina al 0,1% durante 10 minutos. Tras esta incubación, se realizaron 3 lavados de 1 minuto con agua destilada. Las secciones se deshidrataron a través de una serie de lavados de 2 minutos con una concentración creciente de etanol (70%, 96% (x2) y 99% (x3)) y 5 minutos con xileno al 100% (x3). Tras el último paso, se eliminaron los restos de xileno y se montaron los cubreobjetos usando medio de montaje DPX. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta observación.

### 9.1. CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMAGEN DE LA TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

Las imágenes cerebrales se tomaron de 3 portaobjetos por animal y cada portaobjetos contenía 4-5 secciones. La cuantificación del área de la pérdida de tejido cortical se realizó con el software *ImageJ* y utilizando las medidas tomadas en una cuadrícula. Los resultados se expresaron en mm<sup>2</sup> de pérdida tisular tomando como referencia el lado contralateral al daño.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los diferentes experimentos se expresaron con sus correspondientes unidades o como porcentaje (%) respecto al control. Los datos se representaron como media  $\pm$  SD de un  $n \geq 3$  de experimentos independientes.

La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas, para la comparación entre 2 grupos, o ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para la comparación entre más de 2 grupos. Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.



Tabla 1. Aparatos

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
<b>Agitador orbital</b>	<i>rotator stirrer with carousel type design LBX RD80 series</i>	labbox	MIXS-006-001
<b>Agitador</b>	<i>Shaker</i>	RS Lab	RSLAB 7-O
<b>Autoclave</b>	<i>Autoclave 4002518 - Autester ST DRY PV-III 150</i>	JP Selecta	4002518
<b>Bomba de perfusión</b>	<i>Peristaltic Pump FH100M</i>	Thermo Fisher Scientific	72-320-000
<b>Campana de flujo laminar</b>	<i>Campana de flujo laminar</i>	Telstar	AH-100
<b>Campana de gases</b>	<i>Ductless Fume Hood CRUMA 870</i>	CRUMA	CRUMA870
<b>Centrífuga</b>	<i>Eppendorf centrifuges</i>	Eppendorf	5810/5810R
<b>Citómetro de flujo</b>	<i>BD Accuri™ C6 Plus</i>	BD Falcon™ Biosciences	C6 plus
<b>Escáner digital de tejidos</b>	<i>NanoZoomer-XR Digital slide scanner</i>	Meyer	579-0342
<b>Fuente</b>	<i>Fuente de baja tensión P25</i>	Biometra	86040-800
<b>Homogeneizador ultrasonidos</b>	<i>Sonoplus HD2200</i>	Dilabo, s.a	HD2200
<b>Impactador cortical de precisión</b>	<i>PinPoint™ PCI3000 Precision Cortical Impactor™</i>	Hatteras Instruments	PCI3000
<b>Incubador celular</b>	<i>Water-Jacketed, US Autoflow Automatic CO2 Incubator</i>	NuAire, Inc.	NU-4750, NU-4850, NU-4950
<b>Lector de placas</b>	<i>SynergyHT™ Multi-Mode Reader</i>	BioTek Instruments®	SynergyHT™
<b>Lector de gel de agarosa</b>	<i>Lector FLA5100</i>	Fujifilm	06-4-06541
<b>Lector de membranas</b>	<i>Lector LAS-3000 MINI</i>	Fujifilm	LAS-3000
<b>Lisador de tejidos</b>	<i>TissueLyser II</i>	QIAGEN	85300
<b>Lupa</b>	<i>Microscope LED2000</i>	LEICA	LED2000
<b>Microscopio de fluorescencia</b>	<i>Microscope DMI6000 CS</i>	LEICA	DMI6000 CS
<b>Microscopio confocal</b>	<i>Confocal ZEISS LSM 7 DUO</i>	ZEISS	LSM 7 DUO
<b>Nanodrop</b>	<i>NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers</i>	Thermo Fisher Scientific	ND-2000
<b>Pipeta multicanal automática</b>	<i>E1-ClipTip™ Bluetooth™ Electronic Multichannel Pipettes</i>	Thermo Fisher Scientific	4671050BT
<b>Pipetus</b>	<i>EASY 60+ Pipette filling device, 230 V</i>	labbox	EASY-P60-001
<b>Taladro dental</b>	<i>DREMEL® 300 Series (300-1/55)</i>	DREMEL®	300
<b>Termociclador para PCR</b>	<i>PTC-100 Thermal Cycler</i>	MJ Research	8252-30-1001
<b>Termociclador para qPCR</b>	<i>LightCycler® 480</i>	Roche	05015243001
<b>Vortex</b>	<i>vortex stirrer LBX V05 series</i>	labbox	VORX-005-001
<b>Transferencia</b>	<i>Trans-Blot® Turbo™ Transfer System</i>	BIO-RAD	1704150

Tabla 2. Material

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
Aguja 22G	<i>syringe needles 22G</i>	BD Microlance™	300900
Aguja 27G	<i>syringe needles 27G 0.4 x 13 mm</i>	BD Microlance™	002753
Bisturí	<i>Disposable scalpel Sterile)</i>	Swann-Morton®	0501
Cubetas de electroforesis	<i>Cubetas MultiSUB Midi , 10 x 7cm &amp; 10 x 10cm UV tray, 2 x 16 sample combs</i>	Cleaver Scientific LTD	MSMIDIDUO
Imán	<i>DynaMag™-2 Magnet</i>	ThermoFisher Scientific	12321D
Marco estereotáxico	<i>Model 963 Ultra Precise Small Animal Stereotaxic Instrument</i>	Kopf Instruments	963
Filtros de 40 µm	<i>Cell Strainer (40 µm Nylon)</i>	BD Falcon™ Biosciences	0317
Frascos T75	<i>TC Flask T75, Stand., Vent. Cap</i>	SARSTEDT	83,3911,002
Jeringa Hamilton	<i>Jeringa Microliter Serie 600</i>	HAMILTON	HA-87943
Jeringa de insulina	<i>BD MicroFine™+ Insulin Syringes 0.5ml</i>	BD Micro-Fine™	U-100
Kit de transferencia	<i>Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs</i>	BIO-RAD	1704158
Microtubos de 1,5/2 ml	<i>np Safelock-Cap microcentrifuge tube PP, 1,5/2ml, attached cap, boil-proof, transparent, graduated</i>	nerbe plus	04-212-1200 04-232-1200
Microtubos de 0,2 ml	<i>Multiply®-Pro cup o Gefäß 0.2ml, PP</i>	SARSTEDT	72,737,002
Perlas de vidrio	<i>Esferas de Vidrio (Perlas) 2mm</i>	TECNYLAB	BEAD0021K0
Pinza	<i>Dumont® Forceps</i>	SEMKEN	5206-40
Pinza de disección	<i>Micro-Dissecting Forceps</i>	Dumostar	52100-58
Pipeta P10/P100/P100	<i>PIPETMAN Neo® 1-10µl / 10-100µl / 100-1000µl</i>	GILSON®	F144562 F144564 F144566
Pipeta multicanal	<i>PIPETMAN Neo® Multichannel</i>	GILSON®	F14403
Pipeta serológica de 5/10/25 ml	<i>Serological pipette 5ml, 10ml, 25ml</i>	SARSTEDT	86.1253.001 86.1254.001 86.1685.001
Puntas de pipeta automática	<i>Pipette Tips</i>	Thermo Fisher Scientific	4671050BT
Puntas de pipeta P10/P100/P1000	<i>Filter Tip PP natural 0,5–10µl/10-100µl/100-1000µl, short, graduated 96 tips/rack, Gilson type, premium surface, RNase/DNase/DNA/pyrogenfree, sterile RCE/IVD</i>	nerbe plus	07-613-8300 07-642-8300 07-693-8300
Placa de petri	<i>Petri dish 60x15mm with cams</i>	SARSTEDT	82.1194.500
Placa de 96/24/12 pocillos	<i>TC Plate 96, 48, 24, 12 y 6 Well, Standard, F</i>	SARSTEDT	83.3924 83.3922 83.3921
Placas de 384 pocillos para qPCR	<i>LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white</i>	Roche	04729749001
Tijeras	<i>Scissors microscopy straight, pointed/pointed (D)</i>	labbox	SCIS-115-001
Tubos de 15 y 50 ml	<i>Centrifuge tube PP with screw cap PE, 15/50 ml, Ø17x120 mm, conical bottom, tube transparent, cap</i>	nerbe plus	02-502-8001 02-572-8001

Tabla 3. Software

NOMBRE	COMPAÑÍA	APLICACIÓN
Lector de placa	Biotek®	Lector de placa
Lector de gel agarosa	Fujifilm	Lector de gel agarosa
Termociclador	Roche	RT-PCR
Excel	Microsoft	Procesamiento de datos y Análisis estadístico
Fujifilm Image Reader	Fujifilm	Captura de imagen
ImageJ	NIH	Procesamiento y análisis de imagen
MultiGauge	Fujifilm	Análisis de imagen
PowerPoint	Microsoft	Presentación de diapositivas (tesis)
Statgraphics	Statgraphics Technologies	Análisis estadístico
Word	Microsoft	Presentación de documentos (tesis)
ZEN	ZEISS	Captura de imagen en microscopio confocal

Tabla 4. Ratones de experimentación

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
WT	C57BL/6NJ	The Jackson Laboratory	005304
KOGal3	B6.Cg-Lgals3 <sup>tm1Poi</sup> Lgals1 <sup>tm1Rob</sup> /J	The Jackson Laboratory	006354
D-1	CD-1 IGS Mouse	Charles River	CrI:CD1(ICR)

Tabla 5. Fármacos de anestesia

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA
Ketamina	KETAMIDOR® Ketamine 100g/ml	Richter pharma
Dexmedetomidina	DEXDOMITOR® Dexmedetomidine hydrochloride	Zoetis
Buprenorfina	BUPRECARE MULTIDOSIS hidroclicuro de buprenorfina	DIVASA-FARMAVIC (DFV®)
Atipamezol	ANTISEDAN® Atipamezole hydrochloride	Zoetis

Tabla 6. Productos sólidos

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
Agarosa	Agarose (routine grade)	nzytech	MB14401
Albúmina sérica bovina (BSA)	Bovine Serum Albumin (BSA) heat shock fraction, pH 7, ≥98%	Sigma-Aldrich	A7906
Caseína	Casein	Sigma-Aldrich	C3400
PBS	Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (powder)	nzytech	MB18201
Sacarosa	Sucrose for microbiology, ACS reagent, ≥ 99.0%	Sigma-Aldrich	84100
TBS	Tris Buffered Saline (TBS) 10x (powder)	nzytech	MB26601
KCl	Potassium chloride	Sigma-Aldrich	P5405
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	Sigma-Aldrich	H4034

Tabla 7. Productos líquidos

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
Agua para biología molecular	<i>Water for Molecular Biology</i>	nzytech	MB11101
Buffer TAE	<i>Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer 50x, pH 8.3, 50x (liquid)</i>	nzytech	MB20901
Buffer TGS	<i>Buffer TGS (10x Tris/Glycine/SDS)</i>	BIO-RAD	1610772
Buffer de carga	<i>2x Laemmli Sample Buffer</i>	BIO-RAD	1610737
Citrato	<i>Saline Sodium Citrate (SSC) Buffer pH 7.0, 20x (powder)</i>	NZYTech	MB26201
Cloroformo	<i>Chloroform for molecular biology</i>	Applichem Panreac	A1935
Etanol	<i>Ethanol absolute for molecular biology</i>	Applichem Panreac	A8075,2500PE
Etilenglicol	<i>Ethylene glycol anhydrous, 99.8%</i>	Sigma-Aldrich	324558
Gel de electroforesis	<i>12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10well, 30μl</i>	BIO-RAD	4561043
Gentamicina	<i>Gentamicin (10 mg/≥ml)</i>	GIBCO™	15710049
Glicerol	<i>Glycerol BioXtra, ≥99% (GC)</i>	Sigma-Aldrich	G6279
HBSS	<i>HBSS (10X), calcium, magnesium, no phenol red</i>	GIBCO™	14065056
Isopropanol	<i>2-propanol for molecular biology</i>	Applichem Panreac	A3928
Medio de cultivo (DMEM)	<i>DMEM, high glucose, pyruvate</i>	GIBCO™	41966029
Medio de montaje	<i>Fluorescence Mounting Medium</i>	DAKO	S3023
Metanol	<i>Methanol (reag. Ph. Eur.) for analysis, ACS, ISO</i>	Applichem Panreac	131091.1611
Tween-20	<i>Tween® 20</i>	Sigma-Aldrich	P1379
Paraformaldehído (PFA)	<i>Formaldehyde – Solution 4% phosphate buffered for histology</i>	Applichem Panreac	A3697,5000
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<i>Hydrogen peroxide solution 30 % (w/w) in H<sub>2</sub>O, contains stabilizer</i>	Sigma-Aldrich	H1009
Poli-L-Lisina	<i>Poly-L-lysine solution</i>	Sigma-Aldrich	P4707
DPX	<i>DPX Mountant for histology</i>	Sigma-Aldrich	44581
Suero bovino fetal (FBS)	<i>Fetal Bovine Serum, certified, heat inactivated, US origin</i>	GIBCO™	10082147
Suero de caballo (HS)	<i>Horse Serum, heat inactivated, New Zealand origin</i>	GIBCO™	26050070
Suero fisiológico	<i>Suero fisiológico vitulia Sol. para perfusión 0,9%</i>	ERN	615088
Tritón	<i>Triton™ X-100 laboratory grade</i>	Sigma-Aldrich	X-100
Xileno	<i>Xylene - Mixture of isomeres technical grade C</i>	Applichem Panreac	211769 1714

Tabla 8. Reactivos

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
Alexa 488-Isolectina-B4	Alexa Fluor 488-conjugated isolectin B4	Thermo Fisher Scientific	I21411
Galectina-3	Galectin-3 human	Sigma-Aldrich	G5170
Hoechst	Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10mg/mL Solution in Water	Thermo Fisher Scientific	H3570
Inhibidores de fosfatasa	PhosSTOP™	Sigma-Aldrich	4906845001
Inhibidores de proteasas	Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA Free	Thermo Fisher Scientific	88666
Intercalante del ADN	RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x)	iNtRON Biotechnology	21141
Ioduro de propidio	Propidium iodide solution (1.0 mg/ml in water)	Sigma-Aldrich	P4864
Kit ABC	VECTASTAIN® ABC-HRP Kit (Peroxidase, Standard)	VECTOR Laboratories	PK-4000
Kit de ADN polimerasa para PCR	MyTaq™ Red DNA Polymerase	BIOLINE	BIO-21110
Kit de ADN polimerasa para qPCR	SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	BIOLINE	BIO-98020
Kit de cuantificación de galectina-3	BGM Galectin-3® (Galectin-3 Assay)	BG-Medicine	12684
Kit de extracción de ADN	QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0	Epicentre	QE09050
Kit de inmunoprecipitación	Dynabeads™ Protein Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher Scientific	10006D
Kit de retrotranscripción	RevertAid™ First Str cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	K1622
Kit de revelado	Clarity Max™ Western ECL Substrate	BIO-RAD	1705062
Kit de cuantificación de proteínas	Pierce™ BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible	Thermo Fisher Scientific	23250
Marcador de peso molecular (pb)	100bp DNA gTP-Ladder 50ug/500ul	gTPbio	GTPBM0001
Marcador de peso molecular	Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards	BIO-RAD	1610385
TAMRA	Tetramethylrhodamine (TAMRA) Azide (Tetramethylrhodamine 5-Carboxamido-(6-Azidoheptyl)), 5-isomer	Thermo Fisher Scientific	T10182
Tripsina	0.5% Trypsin-EDTA (10x), no phenol red	GIBCO™	15400
Trisure	TRIsure™	BIOLINE	BIO-38033
Versene	Versene Solution	GIBCO™	15040033

Tabla 9. Anticuerpos de neutralización

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	COMPAÑÍA	REFERENCIA
Anticuerpo de control de isotipo IgG (Ac-IgG)	Mouse IgG1 Isotype Control	Thermo Fisher Scientific	MA1-10407
Anticuerpo de neutralización de galectina-3 (Ac-Gal3)	Mouse Anti-Galectin-3 Neutralization	Thermo Fisher Scientific	MA1-40229

Tabla 10. Anticuerpos primarios

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	Origen	COMPAÑÍA	REFERENCIA	DILUCIÓN
Galectina-3	<i>Goat Anti-Galectin-3</i>	<i>Goat</i>	R&D Systems	AF1197	1:250
Iba1	<i>Rabbit Anti-Iba1</i>	<i>Rabbit</i>	Wako	019-19741	1:500
TMEM119	<i>Rabbit Anti-TMEM119</i>	<i>Rabbit</i>	Abcam	Ab94580	1:100
NeuN	<i>Mouse Anti-NeuN</i>	<i>Mouse</i>	Millipore	MAB-377	1:500
GFAP	<i>Rabbit Anti-GFAP</i>	<i>Rabbit</i>	Medac Diagnostic	RP014	1:500
TLR4	<i>Rabbit Anti-TLR4</i>	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz Biotech.	Sc-10741	
IgG	<i>Rabbit IgG Control</i>	<i>Rabbit</i>	R&D Systems	AB-105-C	

Tabla 11. Anticuerpos secundarios

NOMBRE	NOMBRE ESPECÍFICO	ORIGEN	COMPAÑÍA	REFERENCIA	DILUCIÓN
Anti-Goat Alexa-488	<i>Donkey Anti-Goat Alexa 488 conjugated</i>	Donkey	Thermo Fisher Scientific	A-11055	1:500
Anti-Rabbit Alexa-594	<i>Donkey Anti-Rabbit Alexa 594 conjugated</i>	Donkey	Thermo Fisher Scientific	A-21207	1:500
Anti-Mouse	<i>Donkey Anti-Mouse Biotin conjugated</i>	Donkey	Jackson ImmunoResearch	715-066- 150	1:500
Anti-Rabbit	<i>Donkey Anti-Rabbit Biotin conjugated</i>	Donkey	Jackson ImmunoResearch	715-066- 152	1:500
Anti-Goat	<i>Donkey Anti-Goat Biotin conjugated</i>	Donkey	Jackson ImmunoResearch	705-006- 147	1:500

Tabla 12. Cebadores para PCR

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	COMPAÑÍA
Gal3 Common	CAC GAA CGT TTG CTC TCT GG	Sigma- Aldrich
Gal3 Mutant	GCT TTT CTG GAT TCA TCG ACT GTG G	Sigma- Aldrich
Gal3 wild type	TGA AAT ACT TAC CGA AAA GCT GTC TGC	Sigma- Aldrich

Tabla 13. Cebadores para RT-PCR

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3' SENTIDO	SECUENCIA 5'-3' ANTISENTIDO	COMPAÑÍA
$\beta$ Actina	CCA CAC CCG CCA CCA GTT CG	CCC ATT CCC ACC ATC ACA CC	Sigma- Aldrich
GAL3	CAC AGT GAA ACC CAA CGC AA	TCC CCA GTT ATT GTC CTG CT	Sigma- Aldrich
IL1 $\beta$	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GA	AGG CCA CAG GTA TTT TGT CGT	Sigma- Aldrich
TNF $\alpha$	GGT GCC TAT GTC TCA GCC TC	ACT GAT GAG AGG GAG GCC AT	Sigma- Aldrich
IL6	GAC AAA GCC AGA GTC CTT CAG A	AGG AGA GCA TTG GAA ATT GGG G	Sigma- Aldrich
NOS2	CTG GGG CAG TGG AGA GAT TT	TTG TCT CTG GGT CCT CTG GT	Sigma- Aldrich
CXCL10	AAG CAT GTG GAG GTG CGA C	CTA GGG AGG ACA AGG AGG GT	Sigma- Aldrich
BDNF	AGG ACA GCA AAG CCA CAA TG	GTG CTC AAA AGT GTC AGC CA	Sigma- Aldrich
ARG1	TCA CCT GAG CTT TGA TGT CG	CTG AAA GGA GCC CTG TCT TG	Sigma- Aldrich
Ym1	GTA CCC TGG GTC TCG AGG AA	GCC TTG GAA TGT CTT TCT CCA C	Sigma- Aldrich
TGF $\beta$	TGC GCT TGC AGA GAT TAA AA	CGT CAA AAG ACA GCC ACT CA	Sigma- Aldrich

# RESULTADOS



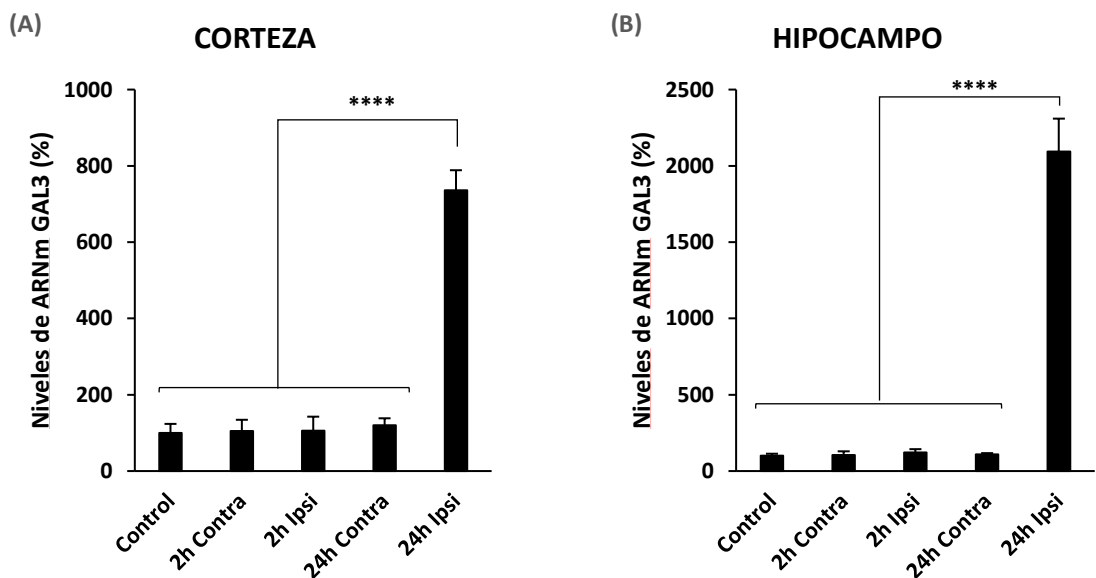


1. LA GALECTINA-3 EN NUESTRO MODELO DE TBI

1.1. LA GALECTINA-3 SE INDUCE EN EL CEREBRO DE RATÓN DESPUÉS DEL TBI

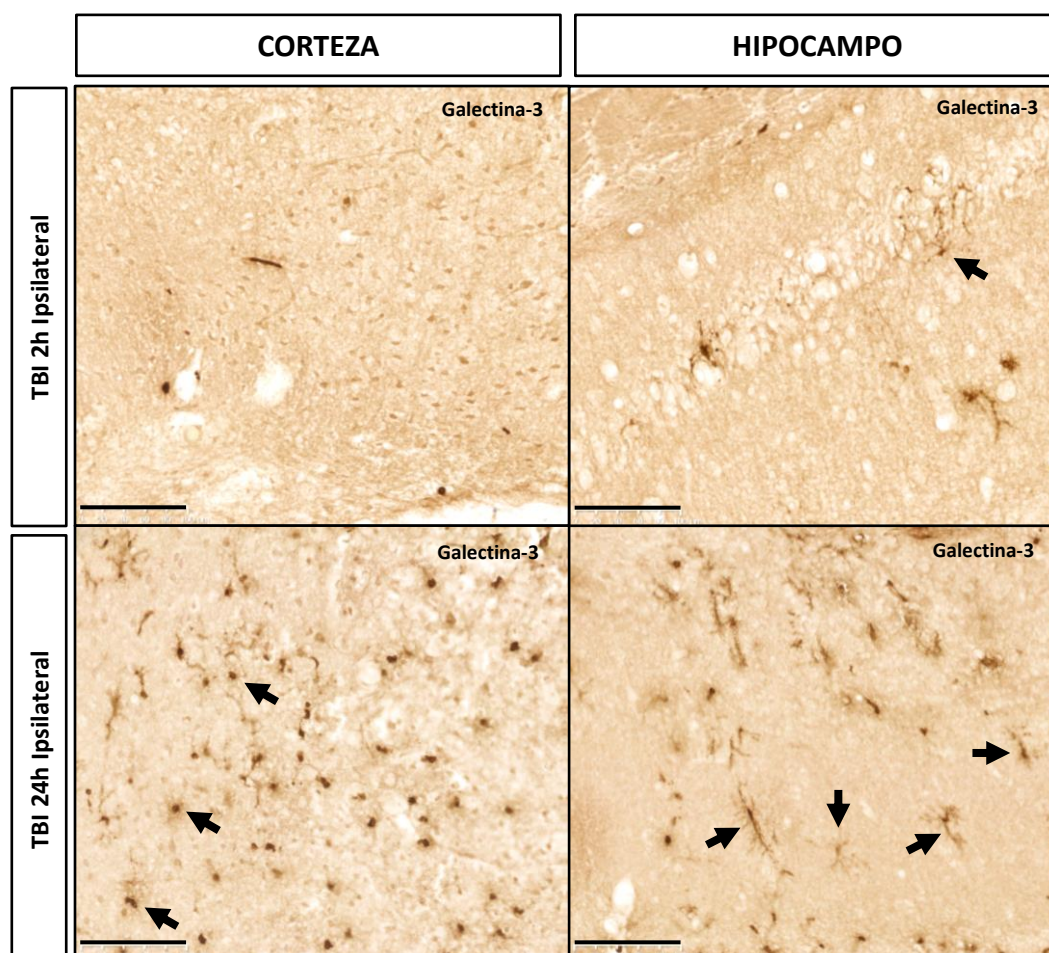
Para el estudio del papel regulador de la galectina-3 en la respuesta inmune asociada a un daño cerebral agudo se utilizó un modelo murino de TBI unilateral. La experimentación se inició con el estudio de la expresión de la galectina-3, analizando cuándo y dónde se inducía esta proteína después del TBI. El estudio se llevó a cabo mediante el análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de la galectina-3 extraído de la corteza (Figura 7A) y del hipocampo (Figura 7B). Se diferenciaron tanto los hemisferios ipsilateral y contralaterales al daño como el tiempo a 2 y 24 horas tras el TBI (Figura 7). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control.

En ambas regiones cerebrales se encontró una clara inducción de la expresión de la galectina-3 en el hemisferio ipsilateral, pero a las 24 horas del daño. El aumento de expresión fue mayor en el hipocampo (2096%) que en la corteza (736%). Los niveles de galectina-3 se mantuvieron sin cambio alguno en el resto de condiciones (Figura 7).



**Figura 7. Expresión génica de la galectina-3 en cerebro de ratón después del TBI.** Análisis por RT-PCR en ratón WT y a las 2 y 24 horas después del TBI en la corteza (A) y en el hipocampo (B), contralateral (Contra) e ipsilateral (Ipsi) al daño. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados como % respecto al control. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Como medición complementaria de expresión y para confirmar los datos obtenidos mediante RT-PCR, se realizó inmunohistoquímica contra galectina-3 en secciones de tejido de corteza e hipocampo ipsilateral de los ratones (Figura 8).



**Figura 8. Expresión de la galectina-3 en cerebro de ratón después del TBI.** Inmunohistoquímica de la galectina-3 en la corteza y el hipocampo ipsilateral al daño a 2 y 24 horas después del TBI. Las flechas indican ejemplos de alta expresión celular de galectina-3. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

A las 2 horas después del daño la expresión de la galectina-3 fue casi inexistente, mientras que a las 24 horas del TBI se pudo observar un claro aumento de células galectina-3 positivas (las flechas señalan ejemplos). Esta situación concuerda perfectamente con lo obtenido en el análisis por RT-PCR de la expresión génica de la galectina-3, donde el pico de inducción de la expresión de la galectina-3 se encuentra exclusivamente a las 24 horas del TBI y solo en el lado ipsilateral al daño.

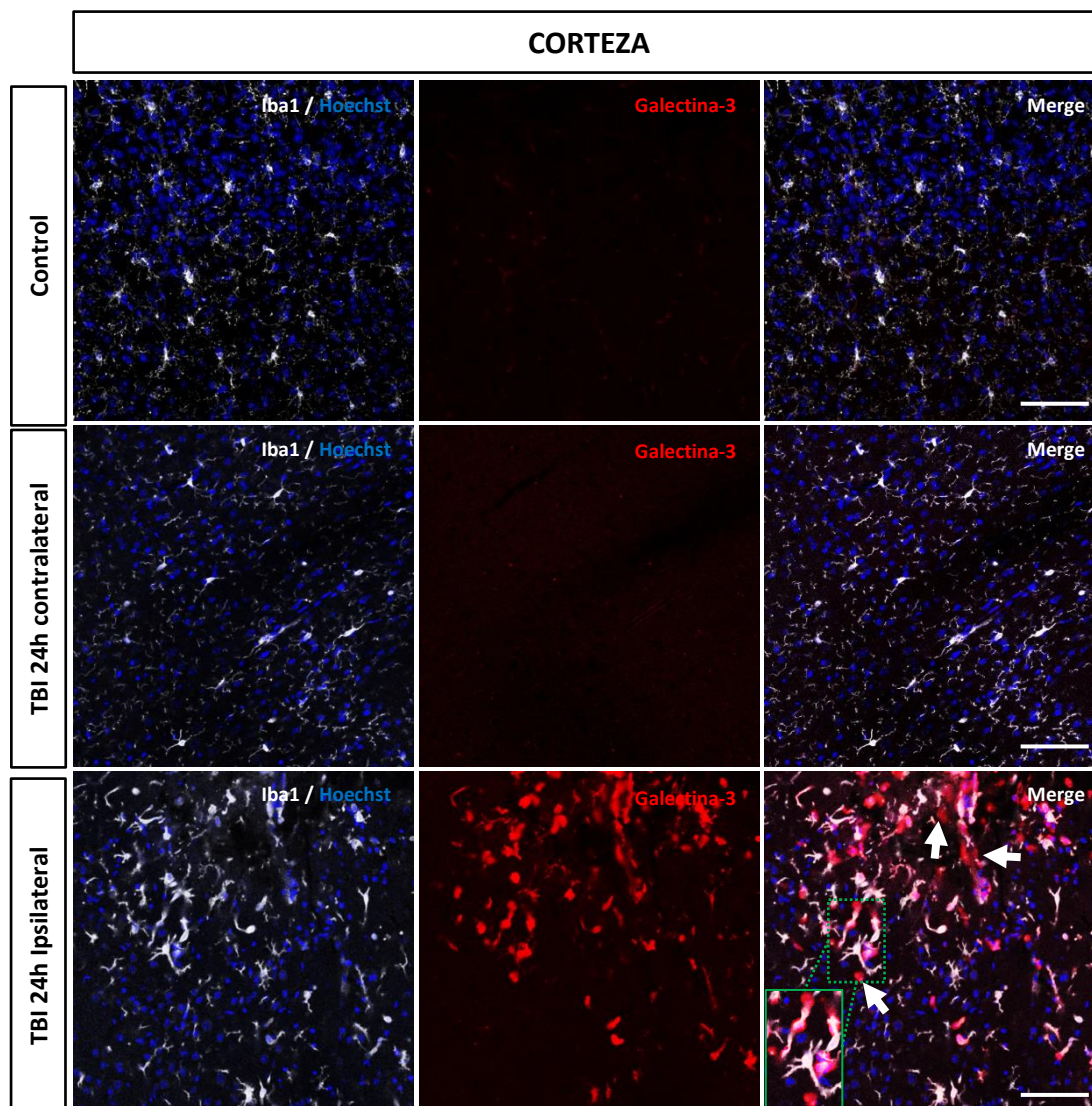
## 1.2. LA GALECTINA-3 SE EXPRESA PREDOMINANTEMENTE EN CÉLULAS MICROGLIALES

Una vez demostrada la expresión de la galectina-3 en cerebro sometido a nuestro en nuestro modelo TBI, quisimos estudiar qué grupo celular era el responsable de dicha expresión. Para ello, utilizamos secciones cerebrales y realizamos un análisis de colocalización por inmunofluorescencia con un doble marcaje contra el marcador microglial Iba1 y galectina-3 (específico para la proteína). Se utilizó Hoechst como marcador específico de núcleos celulares (Figuras 9 y 10).

El estudio por inmunofluorescencia mostró que la mayoría de las células que mostraron una alta expresión de galectina-3 eran células Iba1-positivas, las cuales tenían altos niveles de expresión de Iba1 y morfología ameboide, típico de la microglía activada o reactiva. Esto se observó tanto en la corteza (Figura 9) como en el hipocampo (Figura 10) y solo en el hemisferio ipsilateral a las 24 horas después del impacto.

El estudio a nivel cortical (Figura 9) mostró un mismo patrón de expresión de Iba1 y galectina-3 en los tejidos procedentes de ratones controles y en los tejidos contralaterales al daño de ratones 24 horas después del TBI. En estos dos casos no se encontró expresión de la galectina-3 y el marcaje de Iba1 identificó una población microglial residente con un pequeño cuerpo celular y gran cantidad de ramificaciones (típico de la microglía no activada). Por otro lado, las imágenes obtenidas de corteza ipsilateral al daño a las 24 horas del impacto mostraron un aumento drástico en la expresión de ambos marcadores y una morfología típicamente asociada a la microglía activada, con cuerpos engrosados, ramificaciones retraídas y forma ameboide. La mayoría de estas células Iba1-positivas colocalizaron con galectina-3, aunque hubo cierta expresión de galectina-3 en zonas Iba1 y Hoechst negativas (Figura 9. Cuadro

verde ampliado). Esto podría sugerir que este inmunomarcaje galectina-3 positivo fuera galectina-3 liberada al espacio extracelular (indicado por flechas).

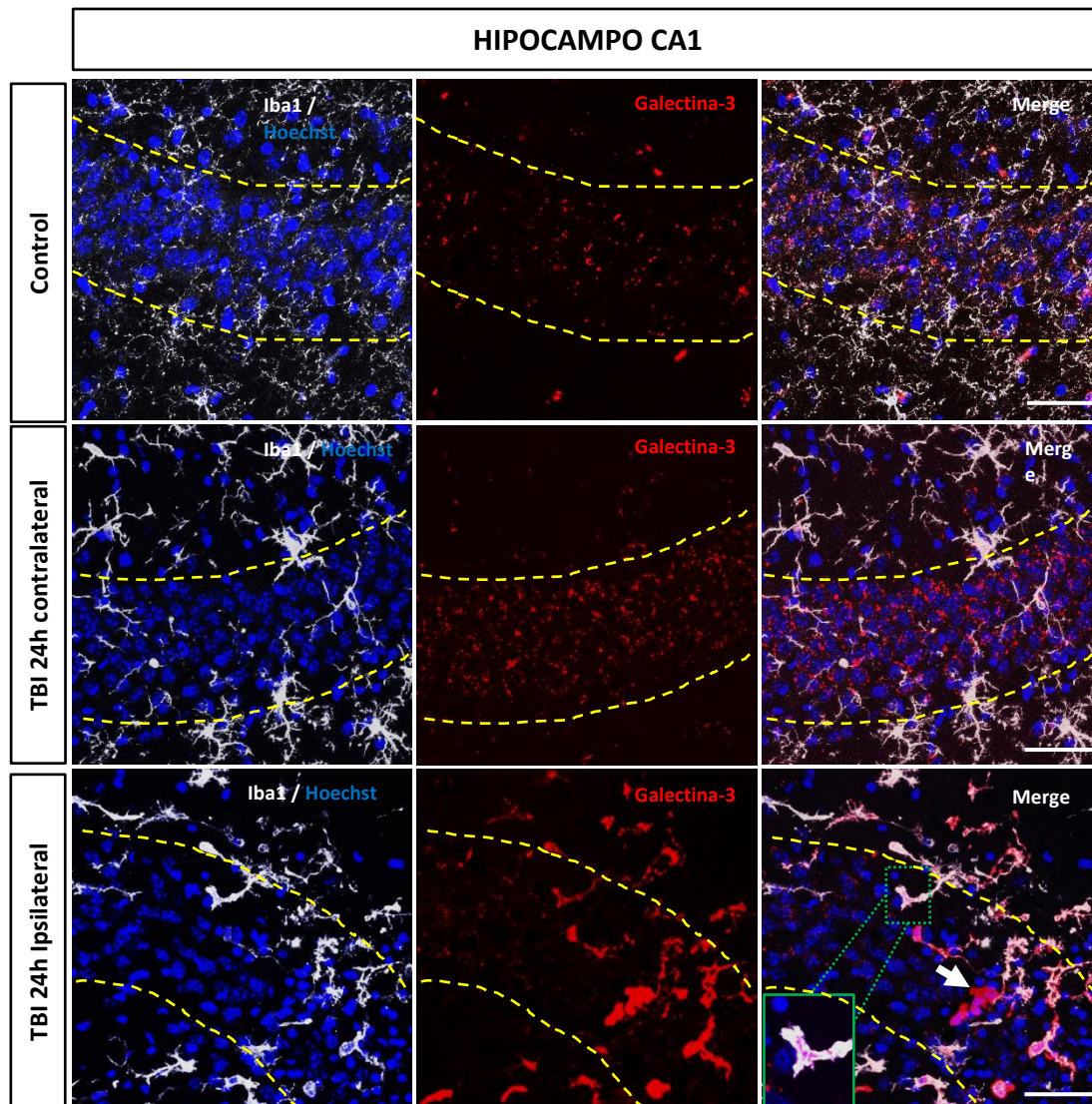


**Figura 9. Colocalización de la galectina-3 en microglía en corteza de ratón después del TBI.** Inmunofluorescencia de colocalización de la galectina-3 y el marcador microglial Iba1, en la corteza de ratón control y 24 horas después del TBI. El Hoechst se utilizó para teñir el núcleo celular. Las flechas indican la expresión de la posible galectina-3 extracelular. Barra de escala: 100µm.

La inmunofluorescencia de Iba1 en tejido hipocampal (Figura 10) también demostró claramente la presencia de microglía reactiva a las 24 horas después del daño, y en este caso tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral al impacto (Figura 10), aunque las células Iba1-positivas del hemisferio ipsilateral aparentaron un mayor grado de activación, con una morfología más redondeada y engrosada y una mayor expresión de Iba1. Además, la colocalización de las células Iba1-positivas con galectina-3 se limitó al lado ipsilateral al daño, como ocurrió en la corteza. También se pudo observar de nuevo galectina-3 aparentemente extracelular (indicado por flechas). En el control lo que se observó fue la presencia de células Iba1-positivas con niveles de expresión y morfología típica de microglía residente (Figura 10).

Se pudo encontrar un marcaje más leve y punteado galectina-3 positivo en las células que pertenecían a la capa de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo, delimitada por líneas discontinuas (Figura 10). Esta expresión punteada de galectina-3 en la capa piramidal CA1 se vio afectada por el traumatismo cortical en el lado ipsilateral al daño a las 24 horas del TBI. Además, en estas condiciones se encuentra invadida por células ameboides galectina-3/Iba1-positivas. Algunas de estas células Iba1-positivas aparentemente rodeaban los núcleos celulares de neuronas piramidales dentro de la región CA1 (Figura 10. Cuadro verde ampliado), sugiriendo típicos procesos de fagocitosis sobre estas células situadas en la capa piramidal CA1.



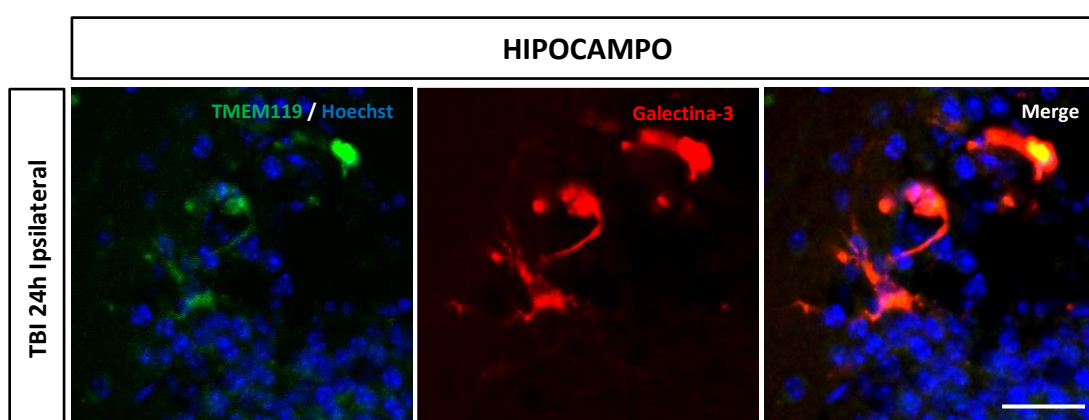


**Figura 10. Colocalización de la galectina-3 en microglía en hipocampo CA1 de ratón después del TBI.** Inmunofluorescencia de colocalización de la galectina-3 y el marcador microglial Iba1, en la zona CA1 del hipocampo de ratón control y 24 horas después del TBI. Las líneas discontinuas definen el área de los cuerpos celulares neuronales piramidales en la región CA1. El Hoechst se utilizó para teñir el núcleo celular. Las flechas indican la expresión de la posible galectina-3 extracelular. Barra de escala: 50µm.

Una vez analizada y localizada (lugar, tiempo y grupo celular) la inducción de la expresión de la galectina-3 en cerebro de ratón después del TBI, se decidió confirmar más específicamente si aquellas células Iba1-positivas que expresaban galectina-3 en nuestro modelo eran ciertamente microglía y no macrófagos extravasados, ya que el marcador Iba1 es específico tanto de microglía como de macrófagos.

Para ello, se realizó otro análisis de colocalización por inmunofluorescencia con un doble marcaje contra el marcador específico microglial TMEM119 (Bennett *et al.*, 2016) y galectina-3 (específico para la proteína). Se utilizó Hoechst como marcador específico de núcleos celulares. Para la inmunofluorescencia se utilizó la región hipocampal ipsilateral al daño y 24 horas después del TBI (Figura 11), ya que fue el lugar y el tiempo más afectados por el impacto y donde se encontró mayor reactividad microglial y expresión de la galectina-3.

Este análisis confirmó que las células que expresaban galectina-3 eran células microgliales TMEM119-positivas (Figura 11).

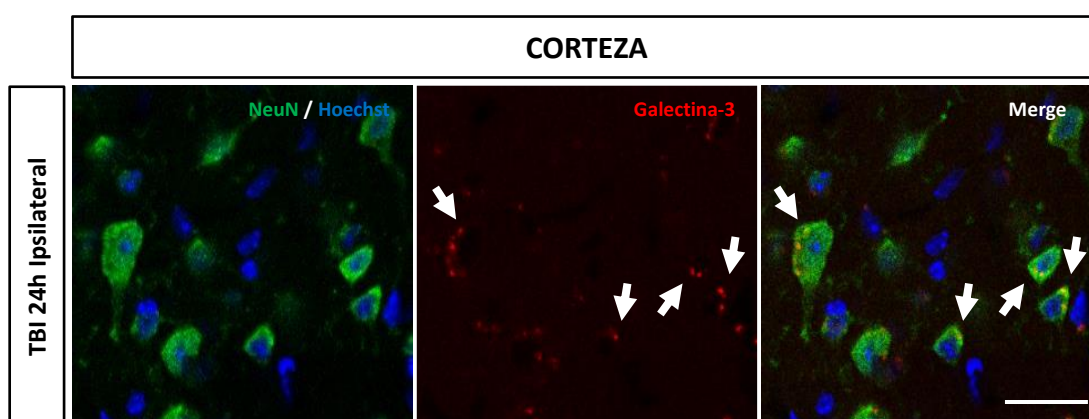


**Figura 11. Colocalización de la galectina-3 en microglía en hipocampo de ratón después del TBI.** Inmunofluorescencia de colocalización de la galectina-3 y el marcador específico microglial TMEM119, en el hipocampo ipsilateral al daño de ratón 24 horas después del TBI. El Hoechst se utilizó para teñir el núcleo celular. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Como ya se mostró, en nuestros ratones experimentales se encontró un marcaje punteado galectina-3 positivo en la zona de la capa de células neuronales piramidales del hipocampo. La expresión neuronal de galectina-3 ya se ha descrito en cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratón (Pesheva *et al.*, 2000) y también dentro del SNC en desarrollo y adulto en un subconjunto de neuronas del DRG en los ganglios espinales (Dodd *et al.*, 1986).

Para confirmar que la población responsable de este marcaje en nuestro modelo de TBI eran neuronas, se realizó otro análisis de colocalización por inmunofluorescencia con un doble marcaje contra el marcador específico neuronal NeuN y galectina-3 (específico para la proteína). Se utilizó Hoechst como marcador específico de núcleos celulares. Para la inmunofluorescencia se utilizaron secciones de tejido procedentes de la corteza ipsilateral al daño y 24 horas después del TBI (Figura 12).

Este análisis confirmó que las células que expresaban galectina-3 de forma puntuada (indicado por flechas) eran células neuronales NeuN-positivas (Figura 12).



**Figura 12. Colocalización de la galectina-3 en neuronas en corteza de ratón después del TBI.** Inmunofluorescencia de colocalización de la galectina-3 y el marcador específico neuronal NeuN, en la corteza ipsilateral al daño de ratón 24 horas después del TBI. El Hoechst se utilizó para teñir el núcleo celular. Las flechas indican la expresión de la galectina-3 en células NeuN-positivas. Barra de escala: 20µm.

Para asegurarnos de que el aparente marcaje extracelular galectina-3 positivo no pertenecía a una expresión por parte de otro grupo celular como los astrocitos, se realizó un último análisis por inmunofluorescencia.

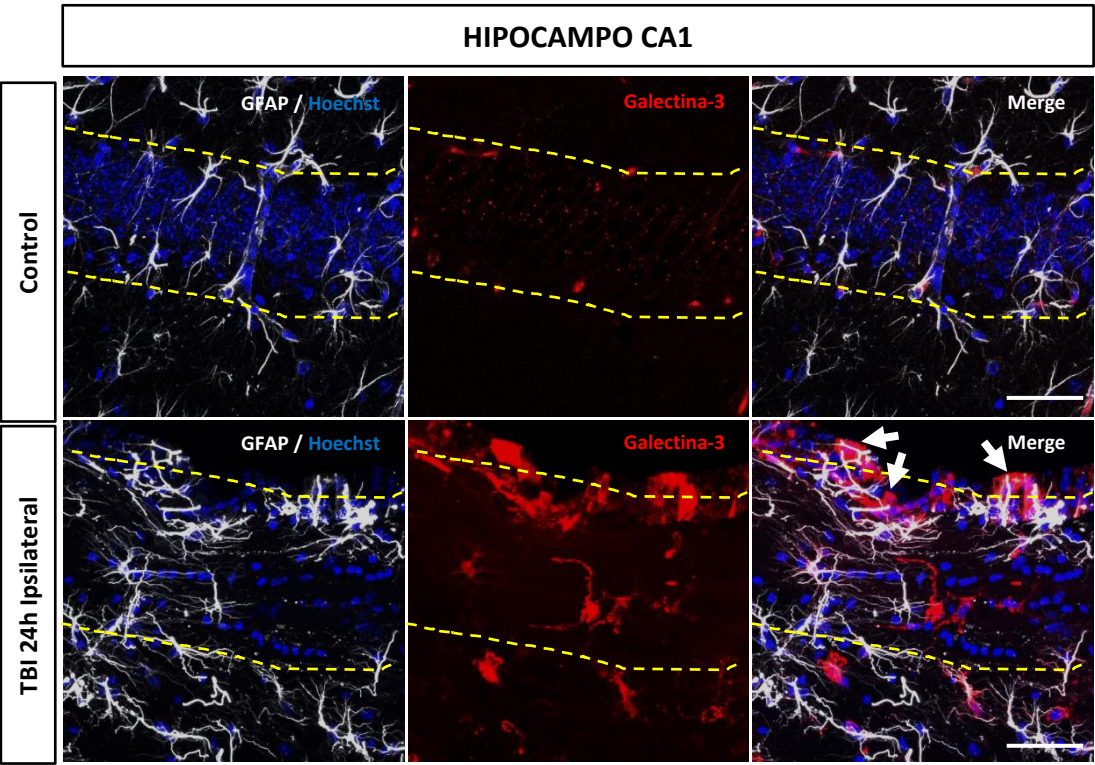
Para esta inmunofluorescencia se utilizó tejido de hipocampo de ratones controles y tejido de hipocampo ipsilateral al daño a las 24 horas después del TBI. Se volvió a utilizar un doble marcaje contra el marcador específico de astrocitos GFAP y



galectina-3 (específico para la proteína). Se utilizó Hoechst como marcador específico de núcleos celulares (Figura 13).

En este caso, de nuevo se observó un marcaje punteado galectina-3 positivo en la capa de células piramidales del hipocampo y el efecto que tiene sobre esta capa el TBI en el lado ipsilateral al daño a las 24 horas del impacto. Igual que sucedía con las células Iba1-positivas, esta capa se encontró invadida por células GFAP-positivas en el lado ipsilateral al daño. Sin embargo, pese a estas similitudes prácticamente ninguna de las células GFAP-positivas colocalizaron con galectina-3 (Figura 13).

Además, se encontró de nuevo un inmunomarcaje galectina-3 positivo en el espacio extracelular (indicado por flechas).



**Figura 13. Colocalización de la galectina-3 en astrocitos en hipocampo de ratón después del TBI.** Inmunofluorescencia de colocalización de la galectina-3 y el marcador específico de astrocitos GFAP, en la región CA1 del hipocampo de ratón control y 24 horas después del TBI. El Hoechst se utilizó para teñir el núcleo celular. Las líneas discontinuas definen el área ocupada por los cuerpos celulares neuronales piramidales en la región CA1. Las flechas indican la expresión de la posible galectina-3 extracelular. Barra de escala: 50µm.

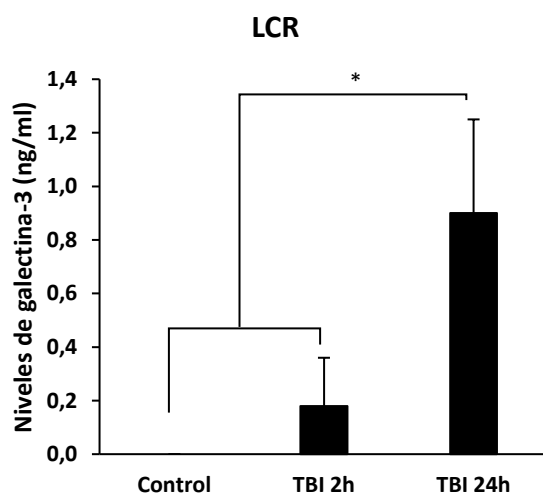
### 1.3. LA GALECTINA-3 SE LIBERA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS DEL TBI

Como se vio en el análisis por inmunofluorescencia contra galectina-3 y marcadores microgliales, neuronales y astrogiales, había un cierto marcaje de galectina-3 positivo aparentemente extracelular. Por este motivo se investigó si la galectina-3 se liberaba en el parénquima cerebral después del impacto cortical realizado en nuestro modelo de TBI.

En consecuencia, se recogieron muestras de LCR de ratones controles no lesionados y de ratones lesionados (a 2 y 24 horas después del TBI) y se analizó la presencia de la galectina-3 mediante la técnica ELISA (Figura 14). Los resultados se expresan como ng de proteína/ml LCR.

Los resultados del análisis mostraron que no es hasta las 24 horas después del TBI cuando se produce un aumento drástico de la liberación de la galectina-3 al LCR. En los ratones controles no se detectaron niveles de la galectina-3 (Figura 14).

Estos datos demuestran que la galectina-3 es liberada al espacio extracelular en el cerebro de ratón después del TBI y que esto sucede a las 24 horas después del impacto, hecho que concuerda con los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión génica e inmunofluorescencia.



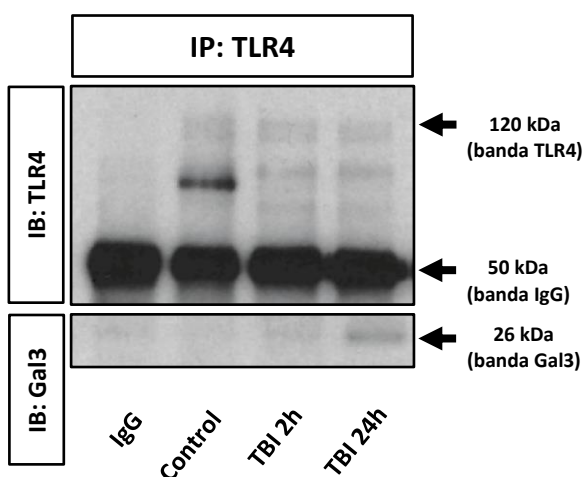
**Figura 14. Cuantificación de los niveles de la galectina-3 liberada al LCR en cerebro de ratón después del TBI.** Niveles de la galectina-3 en el LCR de ratones controles y a las 2 y 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados en ng/ml. La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas. \*  $p < 0,05$ .

#### 1.4. LA GALECTINA-3 SE UNE AL RECEPTOR TLR4 EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI

En base a publicaciones anteriores por parte de nuestro grupo (Burguillos *et al.*, 2015) se quiso saber si la galectina-3 liberada a las 24 horas después de nuestro modelo murino de TBI también podría desempeñar un papel como ligando de TLR4, y por lo tanto, pudiendo disparar la respuesta inflamatoria dependiente de este receptor y asociada a TBI.

Por esta razón se analizó la interacción entre el receptor TLR4 y la galectina-3 mediante el uso de la técnica de IP de extractos de proteínas obtenidos de cerebro de ratones controles y lesionados, a las 2 y 24 horas después del TBI. El inmunoprecipitado se obtuvo usando un anticuerpo anti-TLR4 y se recogió para correrlo en un IB. La membrana de nitrocelulosa del IB se incubó con un anticuerpo específico anti-galectina-3 (Figura 15. Panel inferior) y otro anticuerpo anti-TLR4 (Figura 15. Panel superior). Se utilizó un anticuerpo anti-IgG como control de carga.

Los resultados mostraron una interacción entre la galectina-3 y el receptor TLR4, pero de nuevo solo a las 24 horas (Figura 15). Este es el tiempo al que se ha demostrado que se induce la expresión y la liberación de la galectina-3 en cerebro de ratón tras nuestro modelo de TBI.



**Figura 15. Interacción entre la galectina-3 y TLR4 después del TBI.** Análisis de la unión entre TLR4 y la galectina-3 en todo el extracto completo de tejido cerebral ipsilateral en controles y a 2 y 24 horas después del TBI. Realizado mediante inmunoprecipitación de TLR4 y la incubación con anticuerpo anti-TLR4 (panel superior) y con anticuerpo anti-galectina-3 (panel inferior). IP, inmunoprecipitación; IB, Inmunoblotting; Gal3, galectina-3.

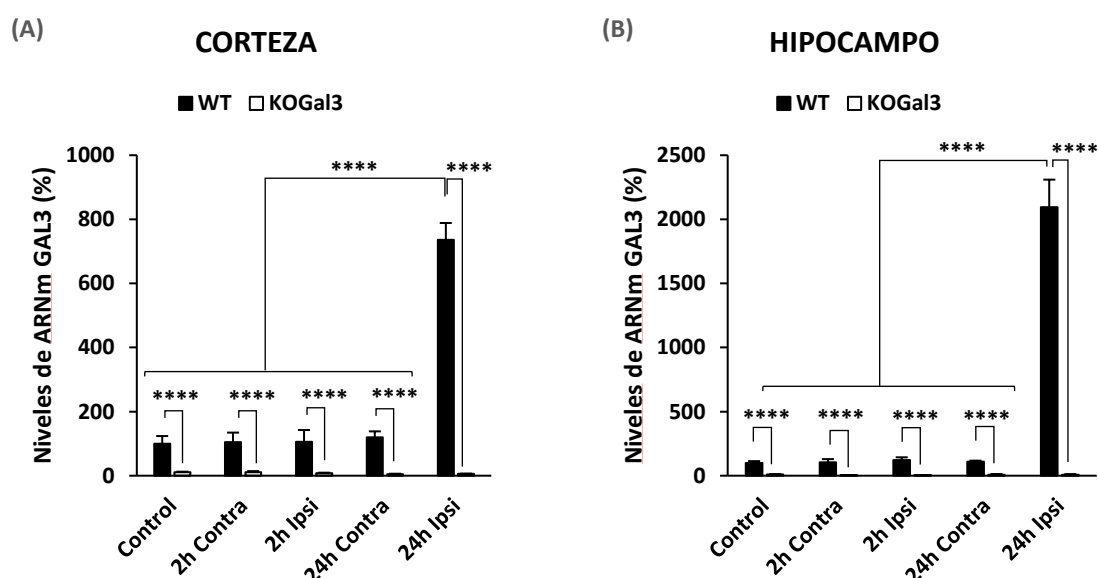
## 2. PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN NUESTRO MODELO DE TBI

### 2.1. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 PRODUCE NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI

Todos estos estudios demuestran que la galectina-3 se induce y se libera en el cerebro de ratón 24 horas después del TBI. Esta inducción se producía exclusivamente en el lado ipsilateral al daño y las células microgliales activadas eran las responsables de su expresión.

Para estudiar el papel de la galectina-3 en nuestro modelo de TBI se utilizaron ratones KOGal3 con ausencia total de la galectina-3, y se analizó el efecto que podría tener sobre el daño cerebral causado por el TBI, ya sea como regulador de la respuesta neuroinflamatoria, activación microglial y/o como protector de la población neuronal.

Se comenzó el estudio del ARNm mediante RT-PCR para cuantificar el nivel de expresión génica de la galectina-3 en corteza (Figura 16A) e hipocampo (Figura 16B). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control.

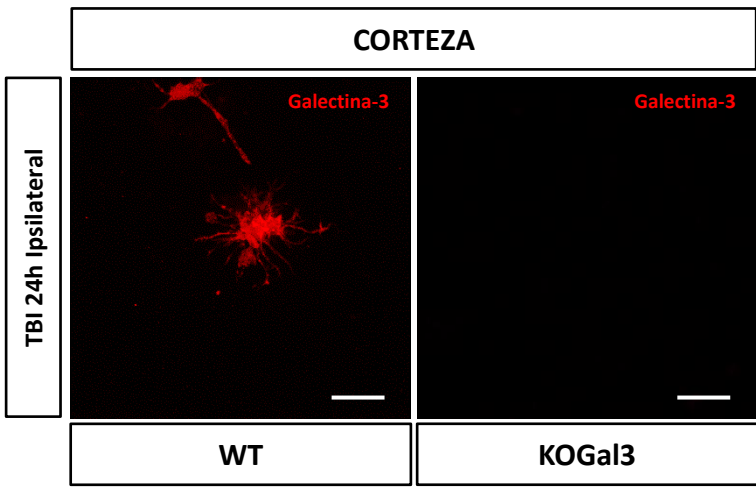


**Figura 16. Expresión génica de la galectina-3 en cerebro de ratón WT y KOGal3 después del TBI.** Análisis por RT-PCR en ratón control y a las 2 y 24 horas después del TBI en corteza (A) y en hipocampo (B), contralateral (Contra) e ipsilateral (Ipsi) al daño. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados como % respecto al control. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La RT-PCR mostró el mismo patrón de expresión génica de galectina-3 encontrado hasta ahora en nuestro modelo en ratones WT y, como era de esperar, las muestras de cerebro procedentes de los ratones KOGal3 no mostraron ningún tipo de inducción ni expresión basal de la galectina-3 (Figura 16).

Aunque quedó demostrado mediante el análisis del ARNm, se quiso confirmar que en los ratones KOGal3 había una ausencia total de la galectina-3 a nivel de proteína (Figura 17).

Mediante inmunofluorescencia contra galectina-3 realizada en secciones de corteza de ratones WT y KOGal3, se pudo confirmar la presencia de marcaje galectina-3 positivo en ratones WT, mientras que en los ratones KOGal3 no se pudo encontrar ningún tipo de marcaje (Figura 17).



**Figura 17. Expresión de la galectina-3 en corteza de ratón WT y KOGal3 después del TBI.** Inmunofluorescencia de galectina-3 en la corteza ipsilateral al daño de ratón WT y KOGal3, 24 horas después del TBI. Barra de escala: 20µm.

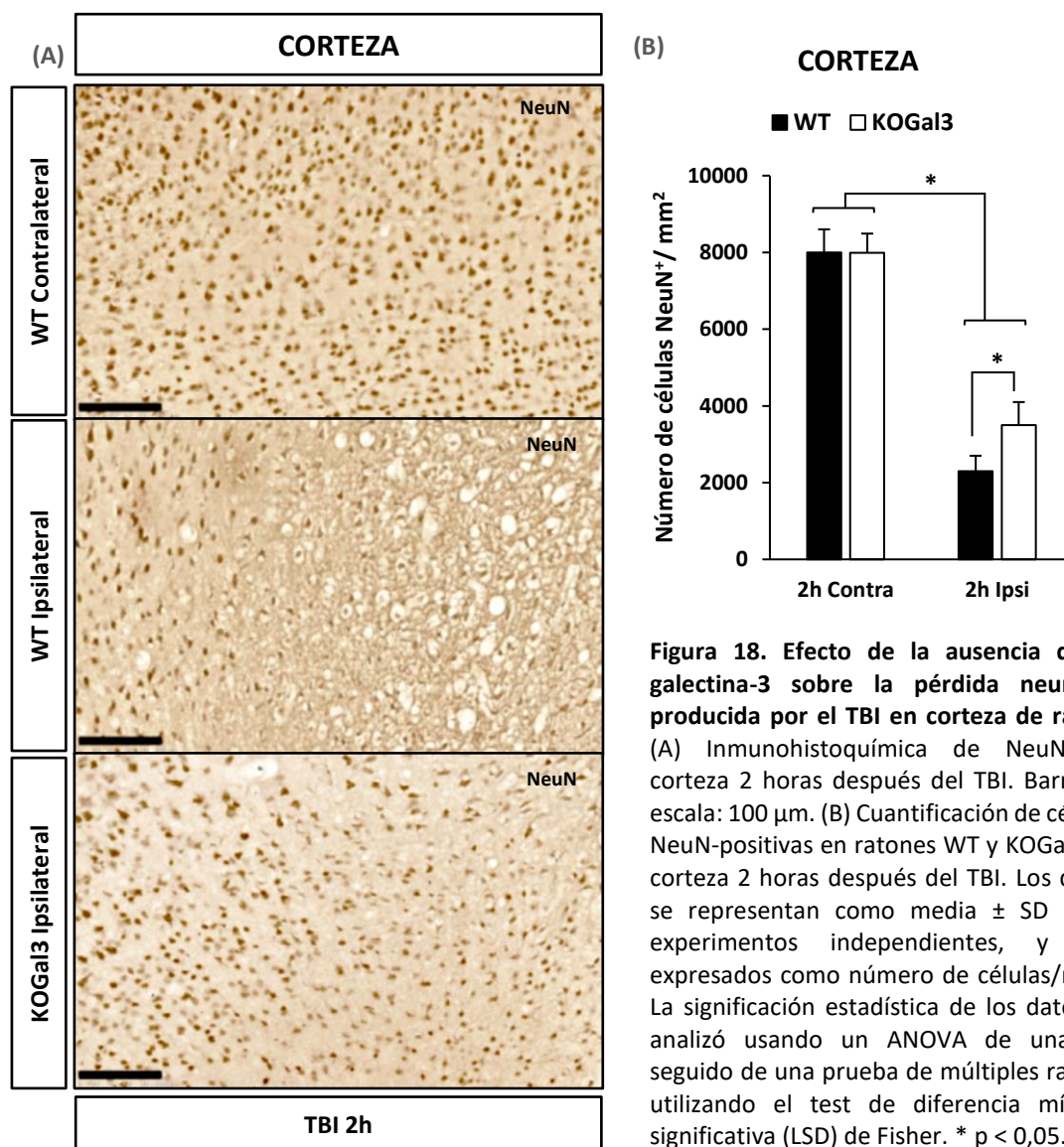
Tras demostrar el efecto del TBI sobre la expresión de galectina-3 en ratones WT y confirmar la ausencia de la galectina-3 en los ratones KOGal3, se decidió analizar por inmunohistoquímica el efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la población neuronal tras el TBI.

Para ello se llevó a cabo inmunohistoquímica contra NeuN en secciones de tejidos contralaterales e ipsilaterales de tres regiones diferentes del cerebro: corteza (Figura 18), hipocampo CA1 (Figura 19) y GD (Figura 20). Sobre estas secciones se hizo la cuantificación del número de células NeuN-positivas en estas tres regiones. En las Figuras 18A, 19A y 20A se muestran imágenes representativas de las tres regiones analizadas para la cuantificación de la pérdida neuronal, comparando ratones WT con KOGal3 y hemisferios contralaterales con los ipsilaterales al daño. Solo se muestran las imágenes de los hemisferios contralaterales al daño de los ratones WT, ya que no se encontraron diferencias en el número de células NeuN-positivas entre ambos ratones en este hemisferio. Los resultados se expresan como número de células NeuN-positivas/mm<sup>2</sup> de tejido analizado.

Como era de esperar, los resultados mostraron en ambos ratones una disminución en el número de células NeuN-positivas producida por el TBI en el lado ipsilateral respecto al lado contralateral al daño. Esta disminución se produjo en las tres regiones analizadas (Figuras 18B, 19B y 20B). Sin embargo, se produjo un efecto neuroprotector en los ratones KOGal3, siendo la pérdida neuronal menor en ausencia de la galectina-3.

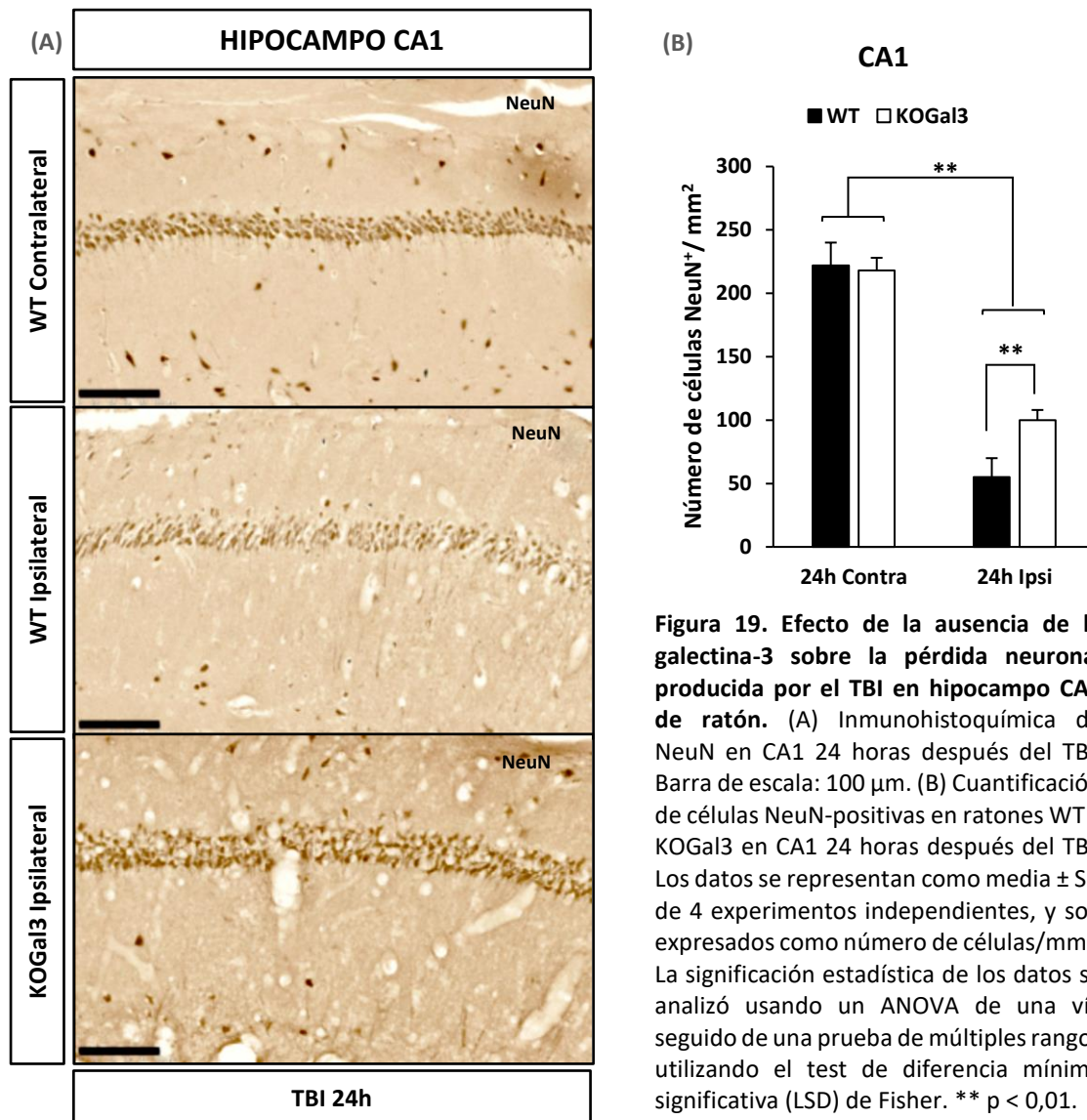
En la corteza ipsilateral al daño y a las 2 horas se pudo observar una disminución en el número de células NeuN-positivas en los dos tipos de ratones (WT, 71%; KOGal3. 56%) (Figura 18B), pero esta pérdida neuronal no se vio afectada de igual manera en los ratones WT que en los KOGal3 utilizados, siendo mayor en los ratones WT (Figura 18B).





**Figura 18. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la pérdida neuronal producida por el TBI en corteza de ratón.** (A) Inmunohistoquímica de NeuN en corteza 2 horas después del TBI. Barra de escala: 100 μm. (B) Cuantificación de células NeuN-positivas en ratones WT y KOGal3 en corteza 2 horas después del TBI. Los datos se representan como media ± SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \* p < 0,05.

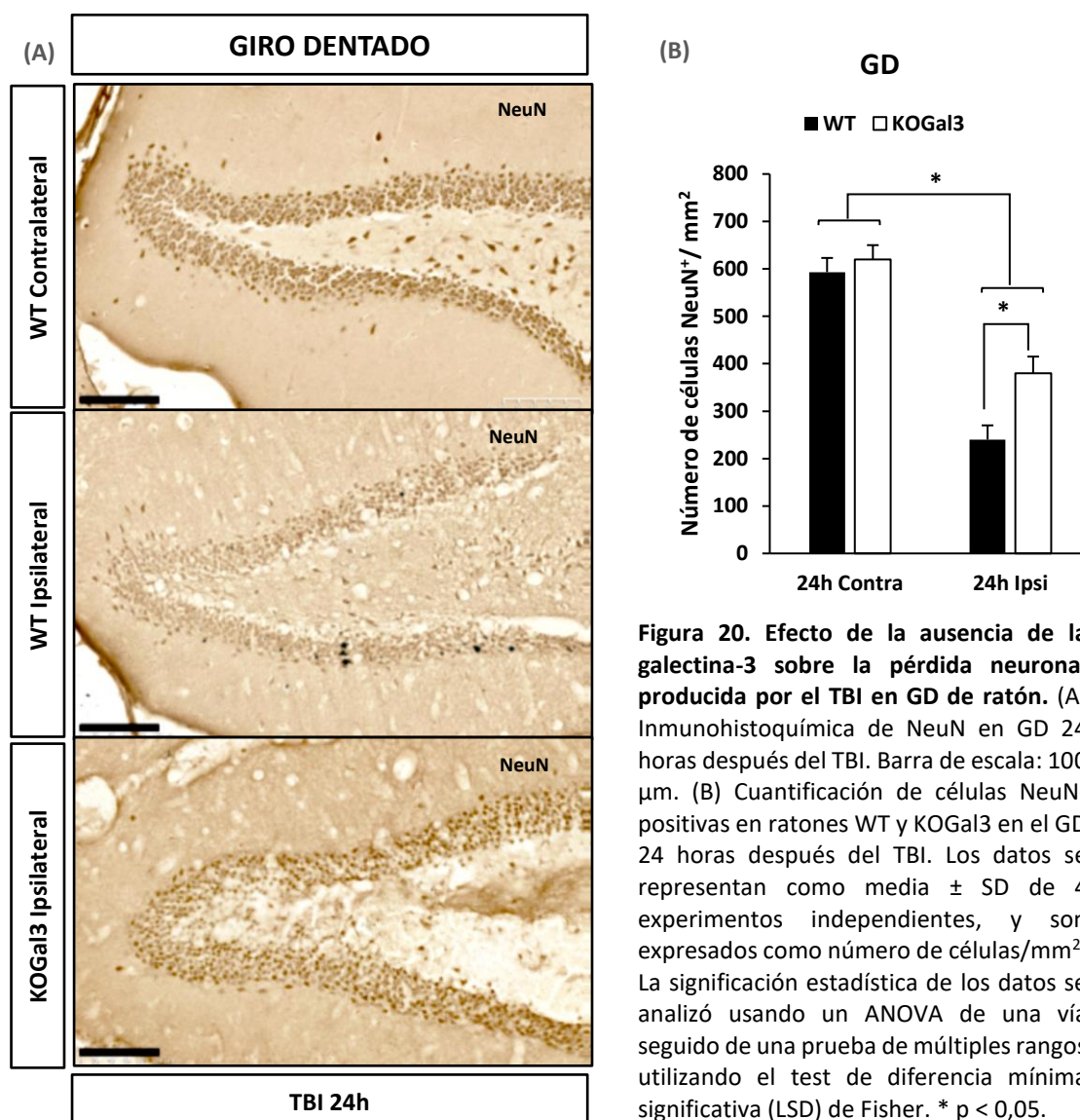
En el caso del análisis de la inmunohistoquímica realizada en tejidos de hipocampo CA1 (Figura 19A), se tuvo que esperar hasta las 24 horas para observar un efecto neuroprotector en los ratones KOGal3 respecto a los ratones WT (Figura 19B), ya que a las 2 horas no había diferencias entre los dos diferentes tipos de ratones. La pérdida de células NeuN-positivas tras el TBI se produjo de nuevo en ambos grupos de ratones (WT, 75%, KOGal3, 54%), pero en los ratones WT de nuevo fue mayor que en los ratones KOGal3 (Figura 19B).



**Figura 19. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la pérdida neuronal producida por el TBI en hipocampo CA1 de ratón.** (A) Inmunohistoquímica de NeuN en CA1 24 horas después del TBI. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación de células NeuN-positivas en ratones WT y KOGal3 en CA1 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*  $p < 0,01$ .

Otra región analizada mediante inmunohistoquímica fue el GD (Figura 20A). En este caso, como en el anterior, no es hasta las 24 horas después del TBI cuando se pudo observar diferencias entre los ratones WT y KOGal3. Los resultados mostraron una disminución en el número de células NeuN-positivas en el lado ipsilateral en los dos grupos de ratones (WT, 60%; KOGal3, 39%), en comparación con el lado contralateral (Figura 20B). Sin embargo, la disminución en el número de neuronas en el lado ipsilateral al daño fue mayor en los ratones WT los cuales, como en los dos casos anteriores, se encontraban más afectados (Figura 20B).

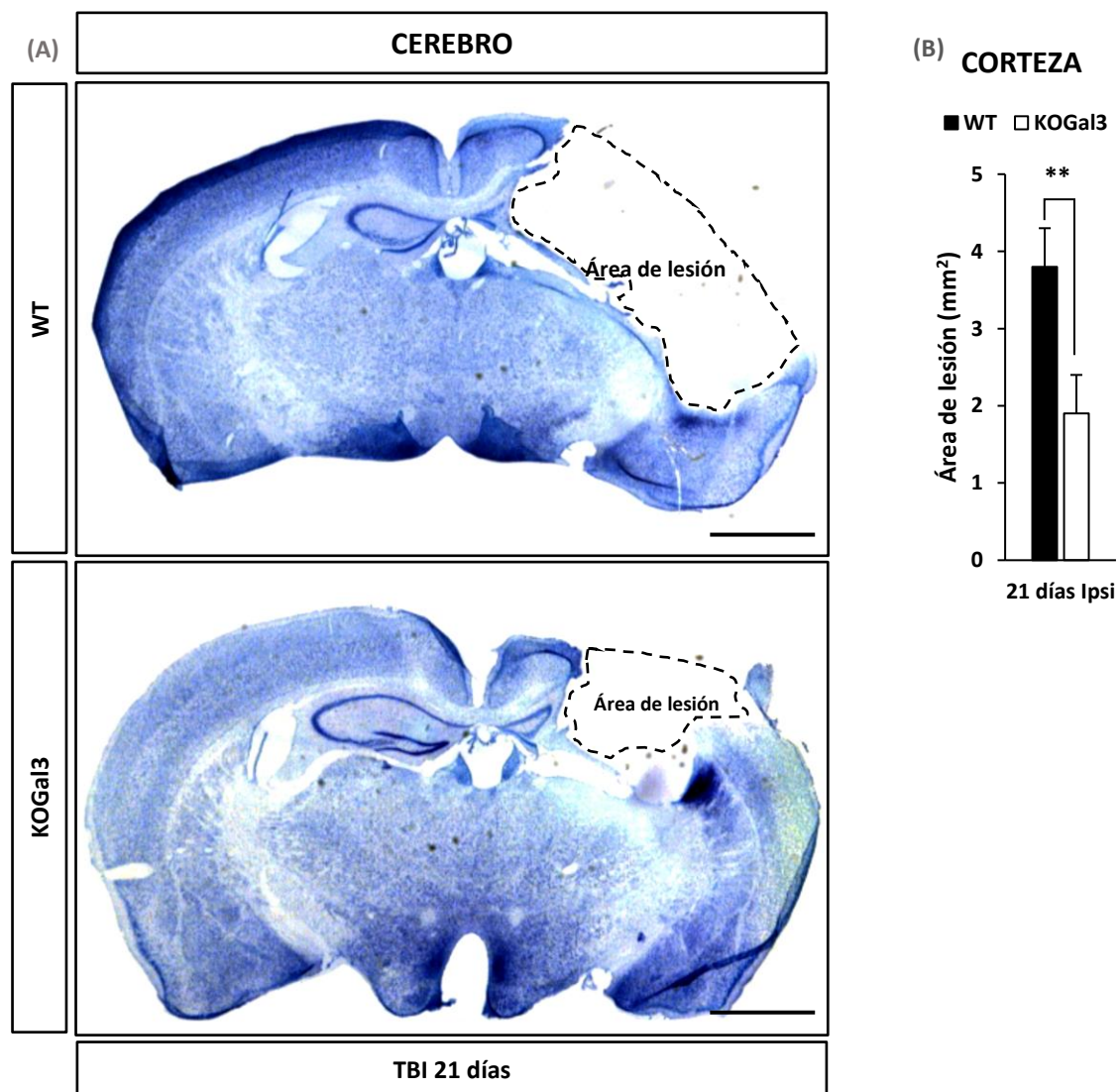




**Figura 20. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la pérdida neuronal producida por el TBI en GD de ratón.** (A) Inmunohistoquímica de NeuN en GD 24 horas después del TBI. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación de células NeuN-positivas en ratones WT y KOGal3 en el GD 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*  $p < 0,05$ .

Estos resultados sugieren que la ausencia de la galectina-3 podría ejercer un efecto neuroprotector frente al TBI. Por ello, se quiso saber si esta neuroprotección, encuadrada dentro de las primeras 24 horas después del TBI, seguía produciéndose a tiempos más largos. Para ello, se realizó una tinción con azul de toluidina en secciones de cerebro y se analizó la pérdida de tejido cortical derivada del impacto a los 21 días del TBI, comparando ratones WT y KOGal3 (Figura 21A). El área de lesión se delimitó por líneas discontinuas, la cuantificación del área se realizó con el programa *ImageJ* y los resultados se expresaron en mm<sup>2</sup> (Figura 21B).

La cuantificación del área lesionada mostró una mayor pérdida de tejido cortical en los ratones WT (2 veces mayor) que en los ratones KOGal3 (Figura 21B). Por lo tanto, todos estos resultados mostraron que la ausencia de la galectina-3 en los ratones KOGal3 ejerce una acción neuroprotectora a largo plazo contra el daño cortical inducido por el TBI, confirmando el efecto neuroprotector observado a corto plazo.



**Figura 21. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la pérdida de tejido cerebral producida 21 días después del TBI.** (A) Tinción con azul de toluidina de cerebro de ratones WT y KOGal3 21 días después del TBI. Barra de escala: 1 mm. (B) Cuantificación del área de lesión cortical por volumetría, en ratones WT y KOGal3 21 días después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados en mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas. \*\*  $p < 0,01$ .

## 2.2. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 DISMINUYE LA PRESENCIA DE CÉLULAS MICROGLIALES TRAS EL TBI

Ya que está descrito que la microglía *Rod* interviene en la respuesta neuroinflamatoria en dos modelos de TBI, se decidió cuantificar el número de estas células existente a tiempos cortos en nuestro modelo murino de TBI.

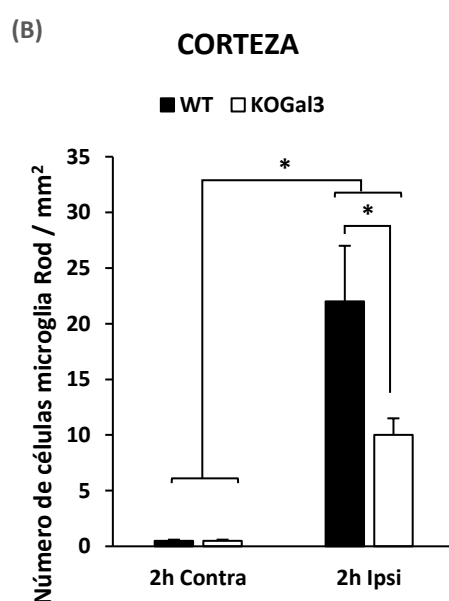
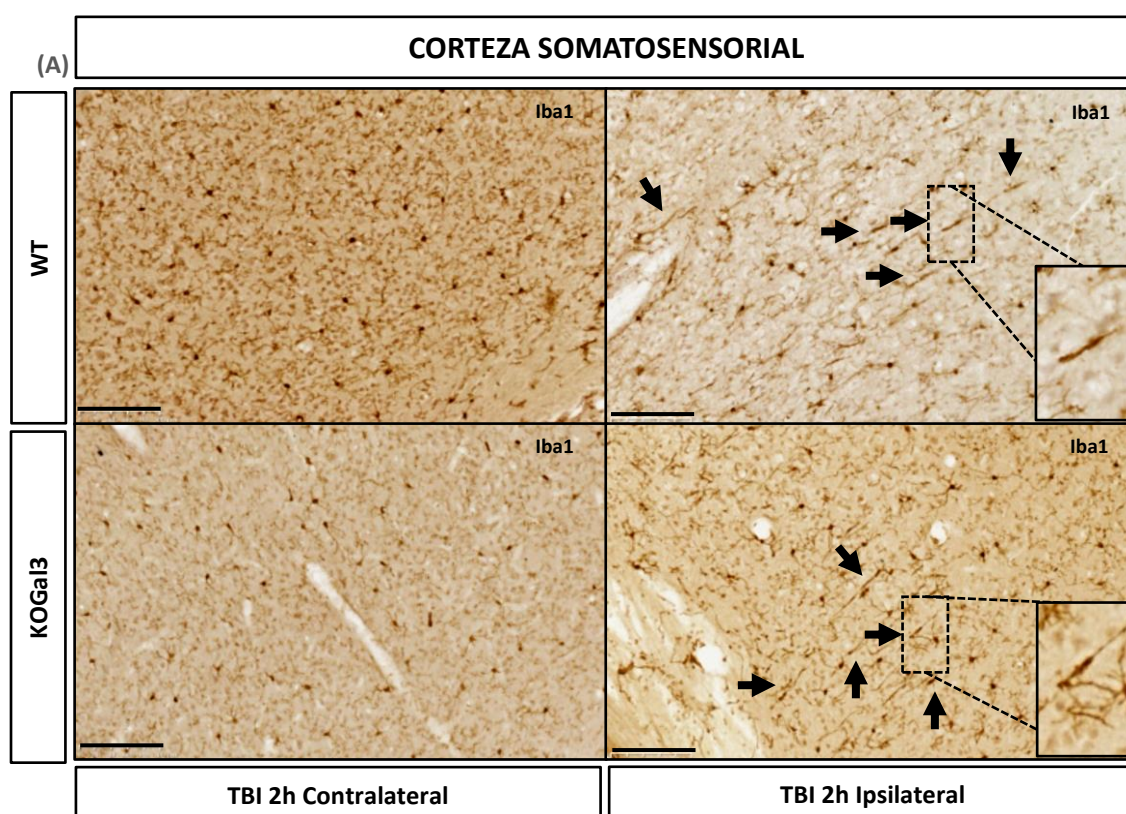
Por ello, se realizó una inmunohistoquímica de tejido procedente de dos áreas diferentes del cerebro donde se ha descrito la presencia y la morfología de las células microgliales *Rod*, concretamente en tejidos de la corteza somatosensorial (Figura 22A) y el hipocampo CA1 (Figura 23A).

Para ello, se utilizaron secciones de ambas regiones a las 2 horas después del TBI. Se realizó comparando siempre entre ratones WT y KOGal3, y entre el lado ipsilateral y el contralateral al daño. Los resultados se expresan como número de células de la microglia *Rod*/mm<sup>2</sup> de tejido.

Los resultados mostraron en ambas regiones del cerebro analizadas la inexistencia de células de la microglía *Rod* en los lados contralaterales de ambos ratones, pero mostraron una drástica aparición de este tipo celular en la zona ipsilateral al impacto como consecuencia directa del daño generado por el TBI. Comparando los resultados obtenidos en el lado ipsilateral al daño de ambos ratones, WT y KOGal3, se detectó una disminución en la cantidad de la microglía *Rod* presente en los ratones KOGal3 frente a los ratones WT.

Estos resultados podrían sugerir una posible explicación a la neuroprotección observada frente al TBI en los ratones KOGal3.

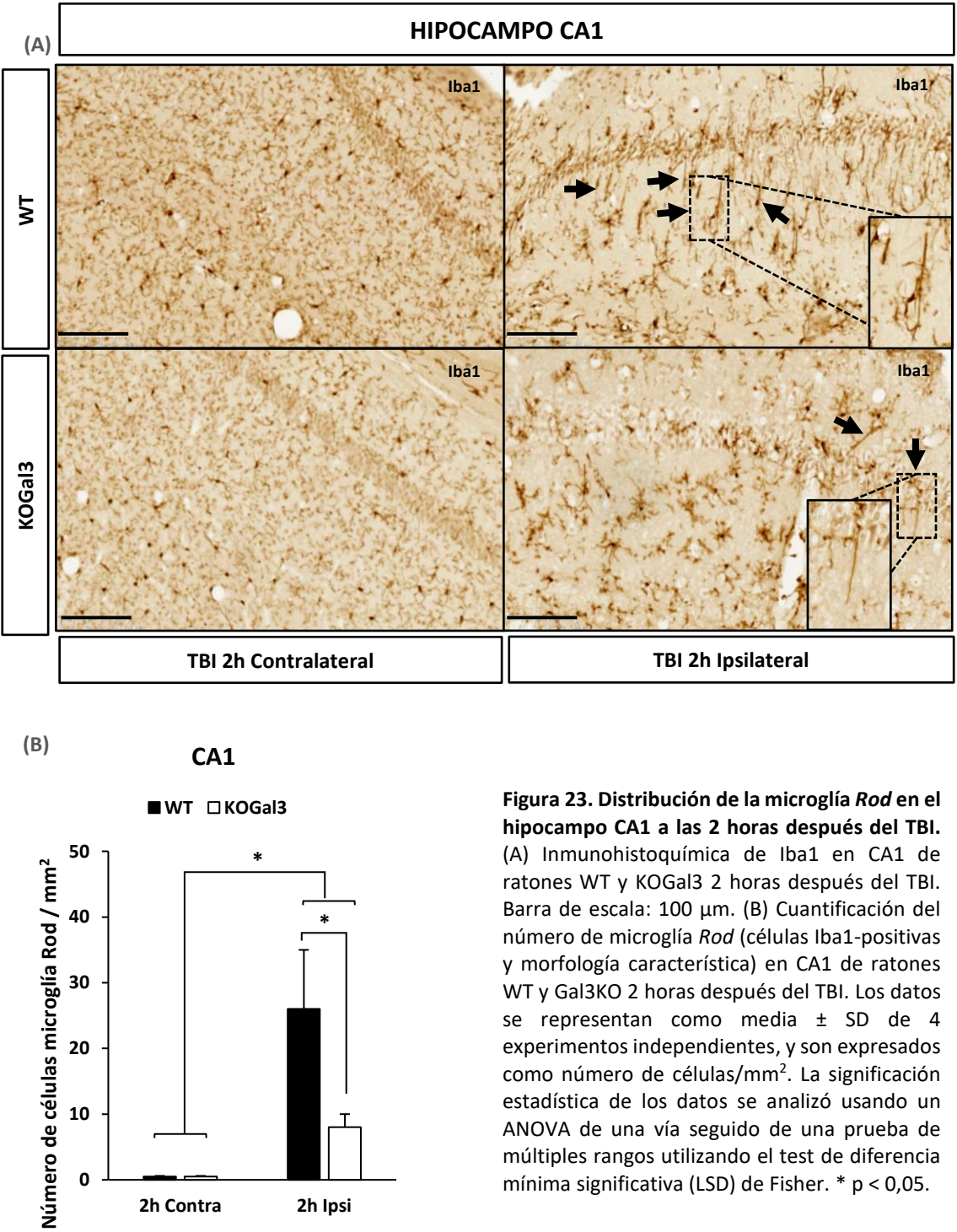
En el caso de la corteza somatosensorial (Figura 22B), el número de células de la microglía *Rod* cuantificado en el lado ipsilateral al daño fue mayor para los ratones WT (2 veces mayor) que para los ratones KOGal3.



**Figura 22. Distribución de la microglía *Rod* en la corteza somatosensorial a las 2 horas después del TBI.** (A) Inmunohistoquímica de Iba1 en la corteza somatosensorial de ratones WT y KOGal3 2 horas después del TBI. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de microglía *Rod* (células Iba1-positivas y morfología característica) en la corteza somatosensorial de ratones WT y Gal3KO 2 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*  $p < 0,05$ .



En el segundo caso analizado, el número de células de la microglía *Rod* en el hipocampo CA1 (Figura 23B) en el lado ipsilateral al daño fue de nuevo mayor en los ratones WT (3 veces mayor) que en los KOGal3.



**Figura 23. Distribución de la microglía *Rod* en el hipocampo CA1 a las 2 horas después del TBI.** (A) Inmunohistoquímica de Iba1 en CA1 de ratones WT y KOGal3 2 horas después del TBI. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de microglía *Rod* (células Iba1-positivas y morfología característica) en CA1 de ratones WT y Gal3KO 2 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*  $p < 0,05$ .

### 2.3. LA AUSENCIA DE LA GALECTINA-3 PRODUCE DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI

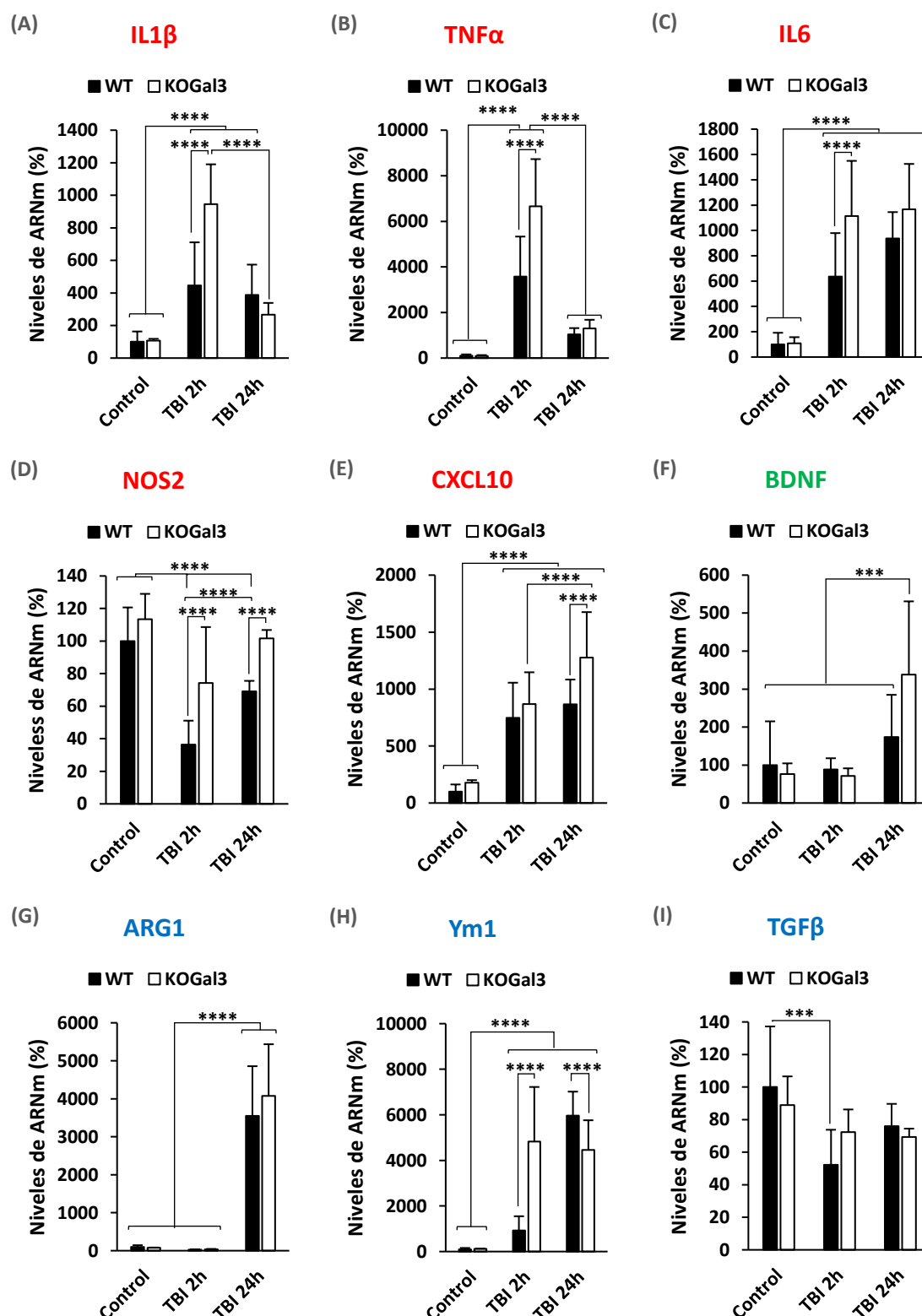
Una posible explicación del efecto neuroprotector observado en los ratones KOGal3 en nuestro modelo de TBI es el papel de la galectina-3 como inmunomodulador. Por ello, se analizó la respuesta neuroinflamatoria desencadenada en el cerebro tras el TBI a través del estudio de la expresión génica de varios marcadores de la respuesta inmune proinflamatoria (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, NOS2 y CXCL10) y antiinflamatoria (ARG1, Ym1 y TGF $\beta$ ), así como la neurotrofina BDNF, por medio de la técnica RT-PCR de ARNm procedente de corteza (Figura 24) e hipocampo (Figura 25). En ambas figuras se representan los resultados obtenidos de muestras procedentes del hemisferio ipsilateral al daño de ambos tipos de ratones, en la condición control y a las 2 y 24 horas del TBI. Los resultados de los hemisferios contralaterales al impacto no se muestran ya que no presentaron cambios respecto al control en ninguno de los marcadores analizados. Los resultados se representan como porcentaje respecto a la condición WT control.

Los resultados obtenidos de muestras corticales (Figura 24) mostraron una inducción de la expresión de marcadores proinflamatorios como IL1 $\beta$  (Figura 24A) en ambos tipos de ratones a las 2 horas tras el TBI, detectándose un mayor nivel de expresión en los animales KOGal3 (WT, 446%; KOGal3, 944%). A las 24 horas después del TBI, este marcador solo permaneció inducido en los ratones WT (388%), mientras que los ratones KOGal3 experimentaron una bajada hasta los niveles basales de expresión de IL1 $\beta$ . El marcador TNF $\alpha$  (Figura 24B) experimentó un aumento en ambos ratones (WT, 3572%; KOGal3, 6659%), pero solo a las 2 horas del TBI y siendo de nuevo mayor en el caso del ratón KOGal3. Otro marcador proinflamatorio como la IL6 (Figura 24C) mostró de nuevo una inducción en ambos ratones tanto a las 2 horas (WT, 635%; KOGal3,

1114%) como a las 24 horas (WT, 936%; KOGal3, 1167%) después del TBI, solo observándose diferencias entre los 2 tipos de ratones a las 2 horas donde de nuevo el ratón KOGal3 presentó una mayor expresión del marcador. El siguiente marcador proinflamatorio, NOS2 (Figura 24D), no mostró inducción alguna tras el TBI, pero en el caso de los ratones WT experimentaron lo contrario, produciéndose una disminución en su expresión tanto a las 2 horas (36%) como a las 24 horas (69%) del impacto. El último marcador analizado del grupo proinflamatorio fue CXCL10 (Figura 24E), el que experimentó al igual que IL6 un incremento en su expresión en ambos ratones tanto a las 2 horas (WT, 748%; KOGal3, 869%) como a las 24 horas (WT, 865%; KOGal3, 1277%) tras el TBI. En el caso de las 24 horas se pudo encontrar una mayor inducción en corteza de ratones KOGal3, tanto respecto al ratón WT como a los resultados obtenidos a las 2 horas en el propio ratón KOGal3.

El análisis de ARG1 (Figura 24G) como marcador antiinflamatorio mostró una inducción en la expresión a las 24 horas del TBI (WT, 3552%; KOGal3, 4079%), no habiendo diferencias entre ambos ratones. En el caso de Ym1 (Figura 24H) se observó una inducción producida por el TBI tanto a las 2 horas (WT, 920%; KOGal3, 4825%) como a las 24 horas (WT, 5960%; KOGal3, 4461%), siendo para el ratón KOGal3 mayor a las 2 horas mientras que a las 24 horas menor. El último marcador antiinflamatorio analizado fue TGF $\beta$  (Figura 24I), que no mostró ningún tipo de inducción en ninguno de los ratones. Sin embargo, el ratón WT a las 2 horas del TBI presentó una disminución en la expresión de este marcador (52%).

El último marcador estudiado fue la neurotrofina BDNF (Figura 24F). El análisis de expresión génica de este marcador presentó exclusivamente una inducción en el ratón KOGal3 y a las 24 horas después TBI (338%).



**Figura 24. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la respuesta inflamatoria producida por el TBI en corteza de ratón.** RT-PCR para marcadores proinflamatorios (rojo) IL1 $\beta$  (A), TNF $\alpha$  (B), IL6 (C), NOS2 (D) y CXCL10 (E); BDNF (F) (verde); y marcadores antiinflamatorios (azul) ARG1 (G), Ym1 (H) y TGF $\beta$  (I). Cuantificación de la expresión génica en la corteza ipsilateral al daño de ratones WT y KOGal3 a las 2 y 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados como % respecto al WT control. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

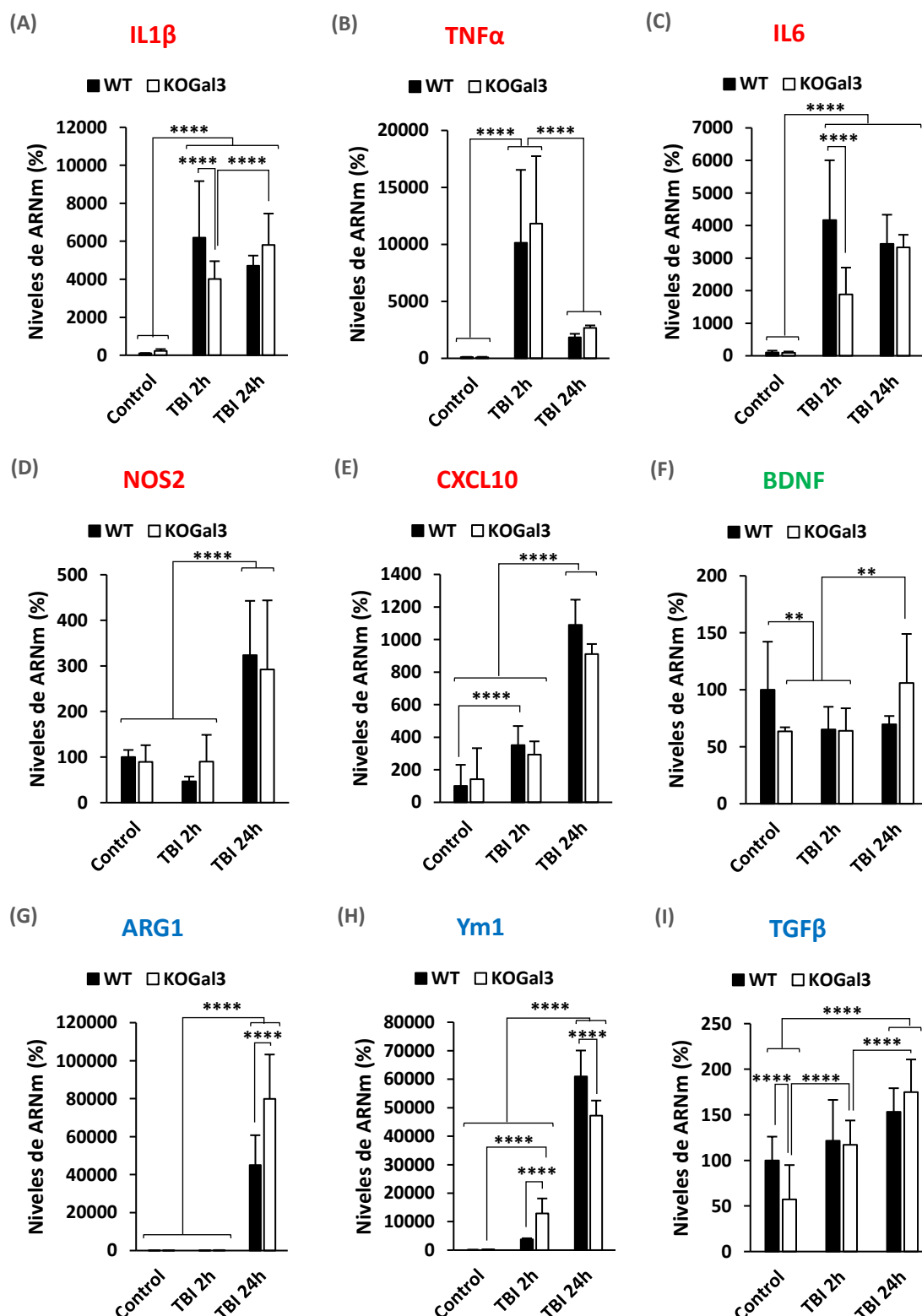


Los resultados obtenidos de muestras procedentes de hipocampo mostraron, tras el TBI, una inducción de la expresión de marcadores proinflamatorios como IL1 $\beta$  (Figura 25A) en ambos ratones a las 2 horas (WT, 6194%; KOGal3, 4008%) y a las 24 horas (WT, 4717%; KOGal3, 5803%) tras el TBI, detectándose un menor nivel de expresión en los ratones KOGal3 a las 2 horas en comparación con los WT. A las 24 horas después del TBI, solo mostró un aumento de expresión en comparación a las 2 horas el ratón KOGal3. El marcador TNF $\alpha$  (Figura 25B) experimentó un aumento en ambos ratones por igual, pero solo a las 2 horas del TBI (WT, 10146%; KOGal3, 11831%). Otro marcador proinflamatorio como IL6 (Figura 25C) mostró de nuevo una inducción en ambos ratones tanto a las 2 horas (WT, 4170%; KOGal3, 1890%) como a las 24 horas (WT, 3435%; KOGal3, 3328%) después del TBI, observándose diferencias entre los 2 tipos de ratones a las 2 horas, donde de nuevo el ratón KOGal3 presentó una menor expresión del marcador. El siguiente marcador proinflamatorio, NOS2 (Figura 25D), presentó una inducción tras el TBI, pero solo en la condición 24 horas y en ambos ratones por igual (WT, 323%; KOGal3, 292%). El último marcador analizado del grupo proinflamatorio fue CXCL10 (Figura 25E), el cual mostró que mientras el ratón KOGal3 no experimentó un incremento en la expresión hasta las 24 horas del impacto (910%), el ratón WT sufrió una inducción progresiva desde las 2 horas (351%) hasta las 24 horas (1090%) después del TBI.

El análisis de ARG1 (Figura 25G) mostró una inducción dramática en la expresión de este marcador antiinflamatorio exclusivamente a las 24 horas del TBI (WT, 45054%; KOGal3, 79924%), teniendo una mayor expresión el ratón KOGal3. En el caso de Ym1 (Figura 25H) se observó un patrón de inducción diferente en todos los sentidos entre los 2 tipos de ratones. En el caso del ratón KOGal3 hubo una inducción progresiva desde las

2 horas (12876%) hasta las 24 horas (47232%) tras el TBI, mientras que el ratón WT experimentó un incremento en la expresión de Ym1 a las 24 horas del daño (60951%). Además, aparecieron diferencias entre ambos ratones tanto a las 2 horas donde el ratón KOGal3 presentó una mayor inducción, como a las 24 horas donde el ratón KOGal3 mostró una menor expresión de este marcador. El último marcador antiinflamatorio analizado fue TGF $\beta$  (Figura 25I) que mostró una expresión basal menor en los ratones KOGal3 (KOGal3, 57%). Además, presentó un patrón parecido al anterior marcador, mostrando el ratón KOGal3 un aumento progresivo en la inducción desde las 2 horas (117%) hasta las 24 horas (175%) del TBI, y el ratón WT solo presentó un incremento en la inducción a las 24 horas del impacto (153%).

El último marcador estudiado fue la neurotrofina BDNF (Figura 25F). El análisis de expresión génica de este marcador mostró una expresión basal menor en los ratones KOGal3 (64%). Además, este ratón fue el único que mostró inducción a las 24 horas (106%), ya que el ratón WT incluso presentó a las 2 horas del TBI una disminución en los niveles de expresión de BDNF (65%).



**Figura 25. Efecto de la ausencia de la galectina-3 sobre la respuesta inflamatoria producida por el TBI en hipocampo de ratón.** RT-PCR para marcadores proinflamatorios (rojo) IL1 $\beta$  (A), TNF $\alpha$  (B), IL6 (C), NOS2 (D) y CXCL10 (E); BDNF (F) (verde); marcadores antiinflamatorios (azul) ARG1 (G), Ym1 (H) y TGF $\beta$  (I). Cuantificación de la expresión génica en el hipocampo ipsilateral al daño de ratones WT y KOGal3 a las 2 y 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados como % respecto al WT control. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

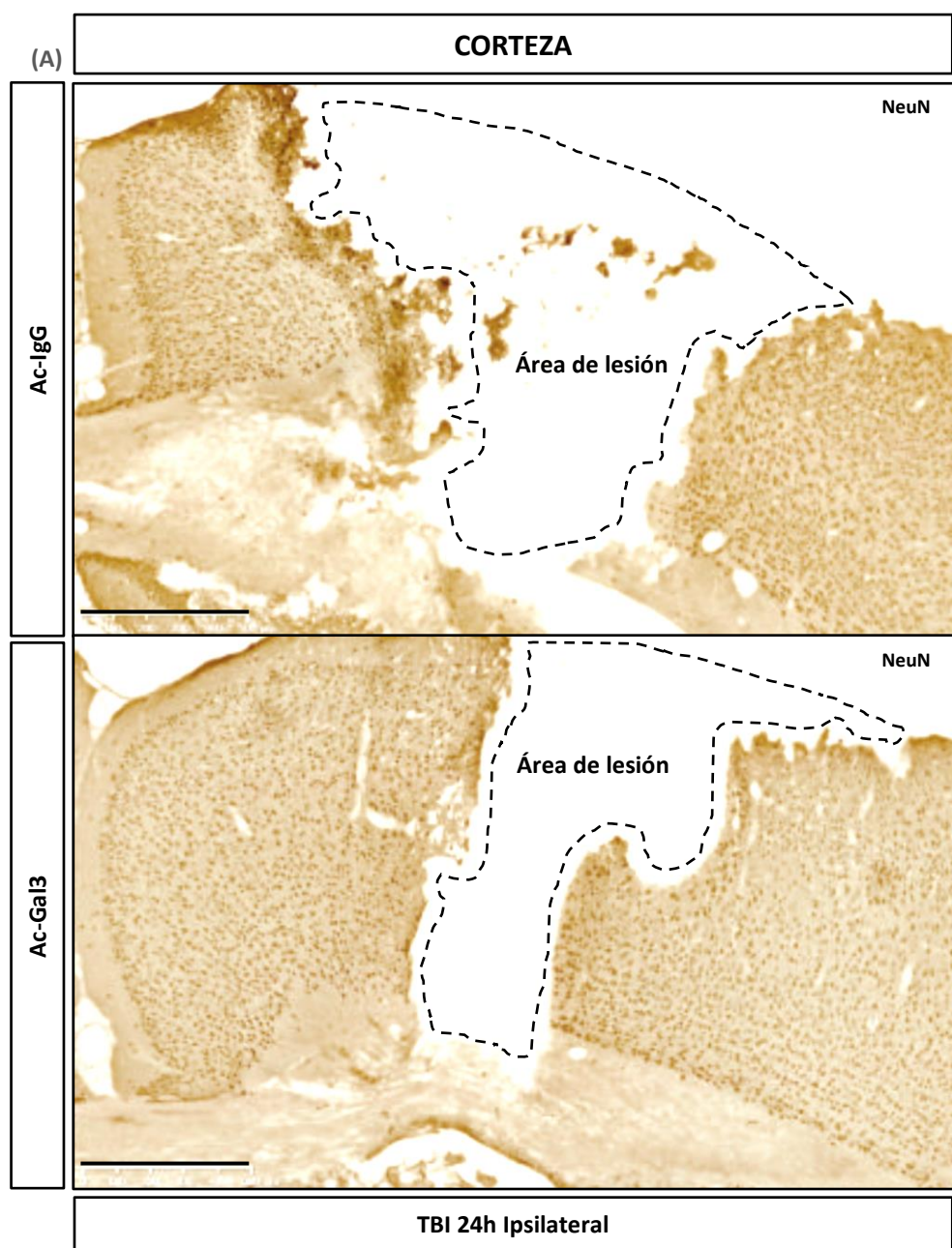
## 2.4. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR PRODUCE NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI

Para estudiar de forma específica el papel de la forma liberada de la galectina-3 en nuestro modelo de TBI, se evaluó el efecto de la neutralización de la galectina-3 extracelular sobre la respuesta inflamatoria y la pérdida neuronal producido tras el TBI mediante el uso de anticuerpos neutralizantes anti-Gal3. Para ello, se utilizaron dos grupos de ratones con TBI, ratones tratados en la zona de daño con el anticuerpo control de isotipo anti-IgG (ratones Ac-IgG) y, por otro lado, ratones tratados con un anticuerpo neutralizante anti-Galectina-3 (ratones Ac-Gal3).

Lo primero que se realizó fue inmunohistoquímica contra NeuN (Figura 26A) e hipocampal (Figura 27A) en la zona ipsilateral de ambos grupos de ratones 24 horas después del TBI. El área de lesión derivada del daño producido por el impacto directo se delimitó con líneas discontinuas. Además, se analizó la integridad del tejido cortical y supervivencia neuronal mediante una cuantificación de las células NeuN-positivas en ambas zonas del cerebro (Figura 26B y 27B).

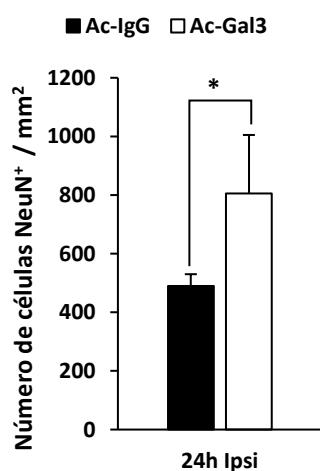
La cuantificación se realizó utilizando el programa *ImageJ* y los resultados se expresan como número de células NeuN-positivas/mm<sup>2</sup> de tejido. Los resultados mostraron un efecto neuroprotector del Ac-Gal3 sobre la población de células NeuN-positivas en corteza (Figura 26) y en hipocampo (Figura 27) 24 horas después del TBI.

En el caso de la inmunohistoquímica de corteza se pudo observar una mayor área de lesión y pérdida tisular en los ratones Ac-IgG (Figura 26A). Los resultados de la cuantificación mostraron diferencias entre el grupo de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, siendo el grupo de ratones Ac-Gal3 el menos afectado presentando un mayor número de neuronas (39% mayor) (Figura 26B).



(B)

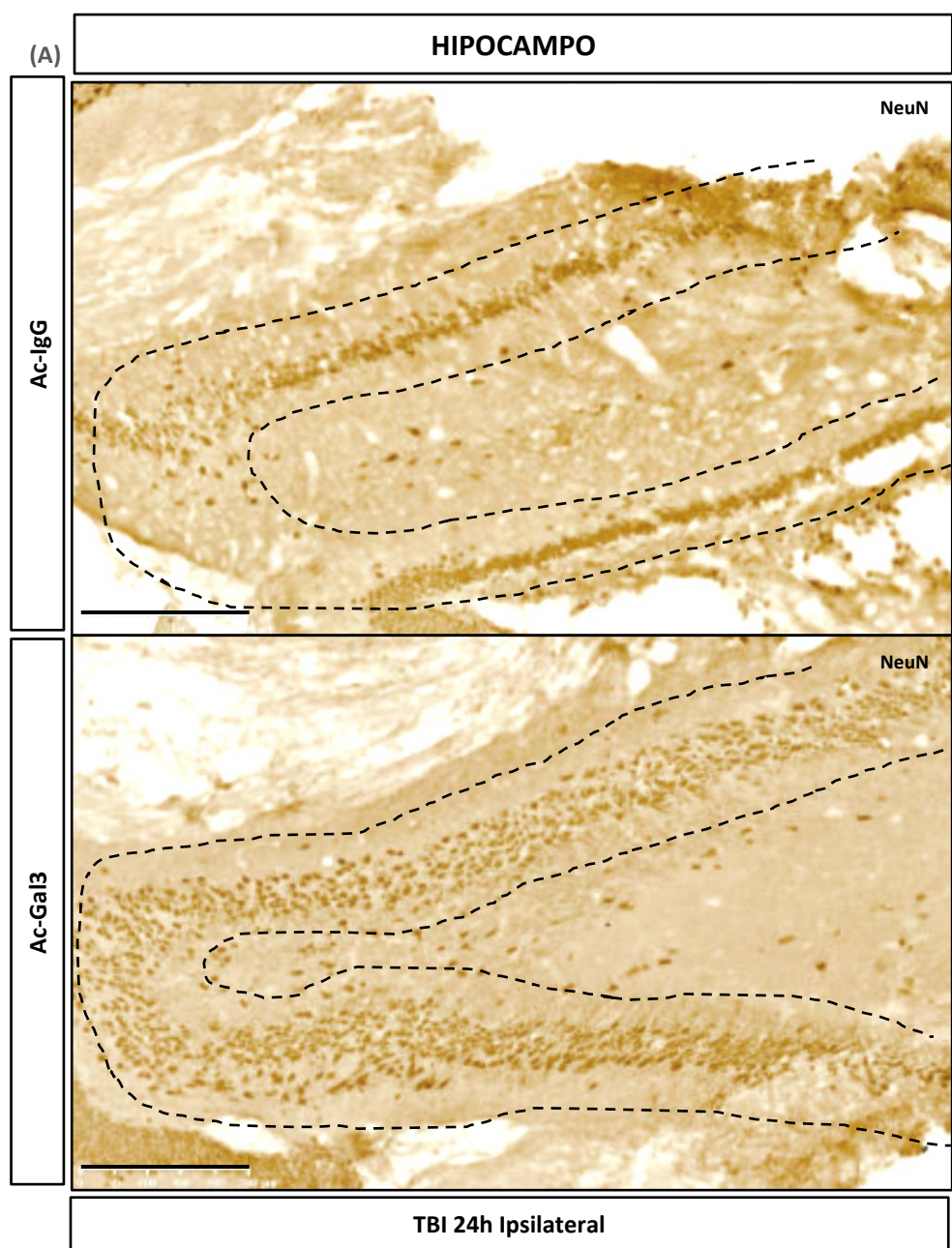
CORTEZA



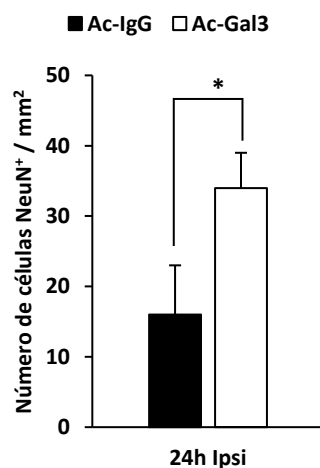
**Figura 26. Efecto de la neutralización de la galectina-3 extracelular sobre el daño tisular y la supervivencia neuronal producida 24 horas después por el TBI en corteza de ratón.** (A) Inmunohistoquímica de NeuN en corteza ipsilateral al daño de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, a las 24 horas después del TBI. Las líneas discontinuas definen el área ocupada por los cuerpos celulares neuronales en corteza. Barra de escala: 250  $\mu$ m. (B) Cuantificación de las células NeuN-positivas en la corteza ipsilateral al daño de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, a las 24 horas del TBI. Los datos se representaron como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas. \*  $p < 0,05$ .

El análisis mediante inmunohistoquímica realizado en tejido de hipocampo de ratones 24 horas después del TBI permitió observar que la capa de células piramidales NeuN-positivas de los ratones tratados con Ac-IgG estaba totalmente alterada, mientras que los tejidos de hipocampo de los ratones con Ac-Gal3 presentaron una evidente protección conservando la integridad de dicha capa de neuronas (Figura 27A). Respecto a la cuantificación de las células NeuN-positivas en el hipocampo realizado en el grupo de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, se observó de nuevo una mayor supervivencia neuronal en el grupo de ratones Ac-Gal3 (47% mayor) (Figura 27B).





(B) HIPOCAMPO



**Figura 27. Efecto de la neutralización de la galectina-3 extracelular sobre el daño tisular y la supervivencia neuronal producida 24 horas después por el TBI en hipocampo de ratón.** (A) Inmunohistoquímica de NeuN de hipocampo ipsilateral al daño de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, a las 24 horas después del TBI. Las líneas discontinuas definen el área ocupada por los cuerpos celulares neuronales piramidales del hipocampo. Barra de escala: 250  $\mu$ m. (B) Cuantificación de las células NeuN-positivas en el hipocampo ipsilateral al daño de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, a las 24 horas del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, y son expresados como número de células/mm<sup>2</sup>. La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas. \*  $p < 0,05$ .

## 2.5. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR DISMINUYE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL TRAS EL TBI

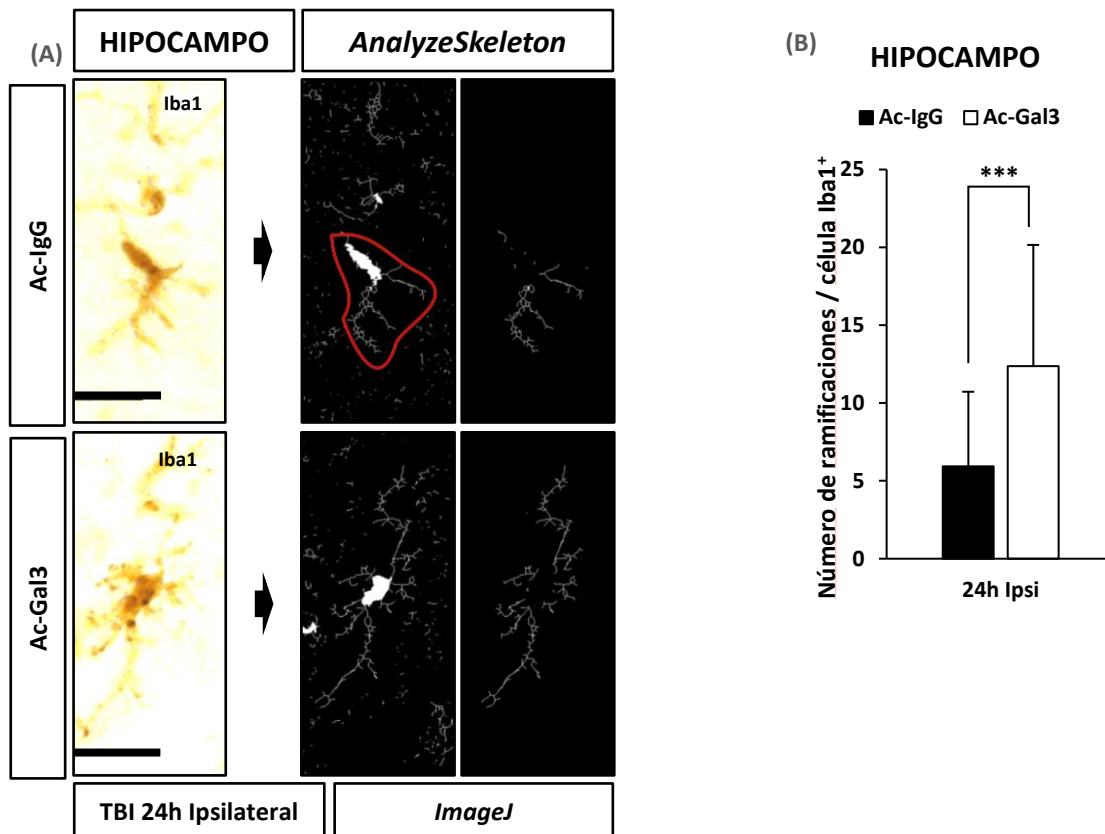
Tanto la ausencia de la galectina-3 como la neutralización de esta ejerce un efecto neuroprotector en corteza e hipocampo en nuestro modelo murino de TBI. Por ello, decidimos estudiar el estado de activación de la microglía 24 horas después del TBI, comparando el grupo de ratones tratados con Ac-IgG con los tratados con Ac-Gal3, esperando encontrar diferencias morfológicas que puedan sugerir una explicación a las diferencias en la pérdida neuronal encontrada entre ambos ratones.

Para ello, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas contra Iba1 de tejidos de hipocampo (Figura 28A) y se analizó el nivel de activación microglial mediante la cuantificación del número de ramificaciones microgliales (Figura 28B). Para ello se utilizó un complemento del programa *ImageJ* llamado *AnalyzeSkeleton*.

Visualmente fue evidente la menor activación encontrada en el caso de la microglía procedente de ratones Ac-Gal3 (Figura 28A), confirmado por los resultados obtenidos de la cuantificación del análisis morfológico (Figura 28B) que mostraron que la microglía en ratones tratados con Ac-Gal3 tenía una morfología menos ameboide y con mayor número de ramificaciones (46% mayor) comparado con el grupo Ac-IgG.

Estos resultados podrían sugerir que la galectina-3 liberada al espacio extracelular juega un papel en la activación de la microglía inducida por el TBI y que esta regulación del estado de activación microglial podría marcar la diferencia en la pérdida neuronal asociada a la neuroinflamación desencadenada en nuestro modelo de TBI. Esto concuerda con lo encontrado en los análisis de supervivencia celular y el análisis de la microglía *Rod* realizados en ratones WT y KOGal3 sometidos a nuestro modelo de TBI.





**Figura 28. Análisis morfológico de células microgliales de hipocampo a las 24 horas después del TBI.**

(A) Inmunohistoquímica de Iba1 en hipocampo de ratón tratados con Ac-IgG y Ac-Gal3, 24 horas después del TBI. Las células Iba1-positivas se analizaron usando el complemento del programa *ImageJ* llamado *AnalyzeSkeleton* para evaluar cambios morfológicos. Las imágenes muestran las células antes y después de la perfilación. Barra de escala: 12,5  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de ramificaciones de células Iba1-positivas. Se analizaron 20 células por ratón y 3 ratones por grupo. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. La significación estadística de los datos se analizó usando una prueba t de Student de 2 colas. \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2.6. LA NEUTRALIZACIÓN DE LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL CEREBRO DE RATÓN TRAS EL TBI

Por último, se analizó la respuesta inflamatoria derivada del TBI a las 24 horas después del impacto. Se compararon los resultados obtenidos en tejido cerebral del hemisferio contralateral e ipsilateral al daño tanto del grupo de ratones tratados con Ac-IgG como con Ac-Gal3, expresando los resultados como porcentaje respecto al lado contralateral del ratón Ac-IgG (Figura 29). En este último análisis del ARNm por RT-PCR no se utilizaron ratones controles y en su lugar se usaron los hemisferios contralaterales al daño, ya que los estudios anteriores mostraron los mismos niveles de expresión de los marcadores analizados.

Los resultados obtenidos mostraron una inducción en la expresión de todos los marcadores analizados en el hemisferio ipsilateral 24 horas tras el TBI. Sin embargo, los únicos marcadores que presentaron diferencias entre ambos grupos de ratones fueron IL1 $\beta$ , IL6 y NOS2 (Figura 29ACD).

En el caso de los marcadores proinflamatorios como IL1 $\beta$  (Figura 29A) se obtuvo una inducción de la expresión en ambos ratones tras el TBI (Ac-IgG, 630%; Ac-Gal3, 380%), detectándose un menor nivel de expresión en los animales Ac-Gal3. El marcador TNF $\alpha$  (Figura 29B) experimentó un aumento en los dos grupos de ratones (Ac-IgG, 230%; Ac-Gal3, 198%), pero sin mostrar ninguna diferencia entre ambos. Otro marcador proinflamatorio como IL6 (Figura 28C) mostró de nuevo una inducción en ambos ratones (Ac-IgG, 1640%; AcGal3, 919%) pero en este caso sí se detectó una diferencia entre los dos grupos de ratones, donde de nuevo el ratón Ac-Gal3 presentó una menor expresión del marcador. El siguiente marcador, NOS2 (Figura 29D), solo presentó inducción tras el TBI en los ratones tratados con Ac-IgG (Ac-Gal3, 216%). El último marcador analizado del

grupo proinflamatorio fue CXCL10 (Figura 29E) el cual experimento, al igual que  $TNF\alpha$ , una inducción en su expresión en ambos ratones (Ac-IgG, 605%; Ac-Gal3, 482%).

Los marcadores antiinflamatorios analizados fueron ARG1, Ym1 y  $TGF\beta$ . El análisis de ARG1 (Figura 29G) mostró una inducción en el lado ipsilateral (Ac-IgG, 2784%; Ac-KOGal3, 2750%), no habiendo diferencias entre ambos grupos de ratones. En el caso de Ym1 (Figura 29H) se observó de nuevo una inducción producida por el TBI, pero sin diferencia alguna entre la neutralización de la galectina-3 y su condición control con el anticuerpo Ac-IgG (Ac-IgG, 436%; Ac-Gal3, 541%). El último marcador antiinflamatorio analizado fue  $TGF\beta$  (Figura 29I) cuyo análisis no mostró ninguno tipo de diferencia entre los grupos de ratones, aunque si presentó inducción en la expresión derivada del TBI (Ac-IgG, 278%; Ac-Gal3, 241%).

El último marcador analizado fue la neurotrofina BDNF (Figura 29F). Su estudio de expresión génica presentó la inducción en el hemisferio ipsilateral tras 24 horas del TBI, pero no mostró ninguna diferencia entre los ratones tratados con Ac-IgG y los tratados con Ac-Gal3 (Ac-IgG, 527%; Ac-Gal3, 437%).

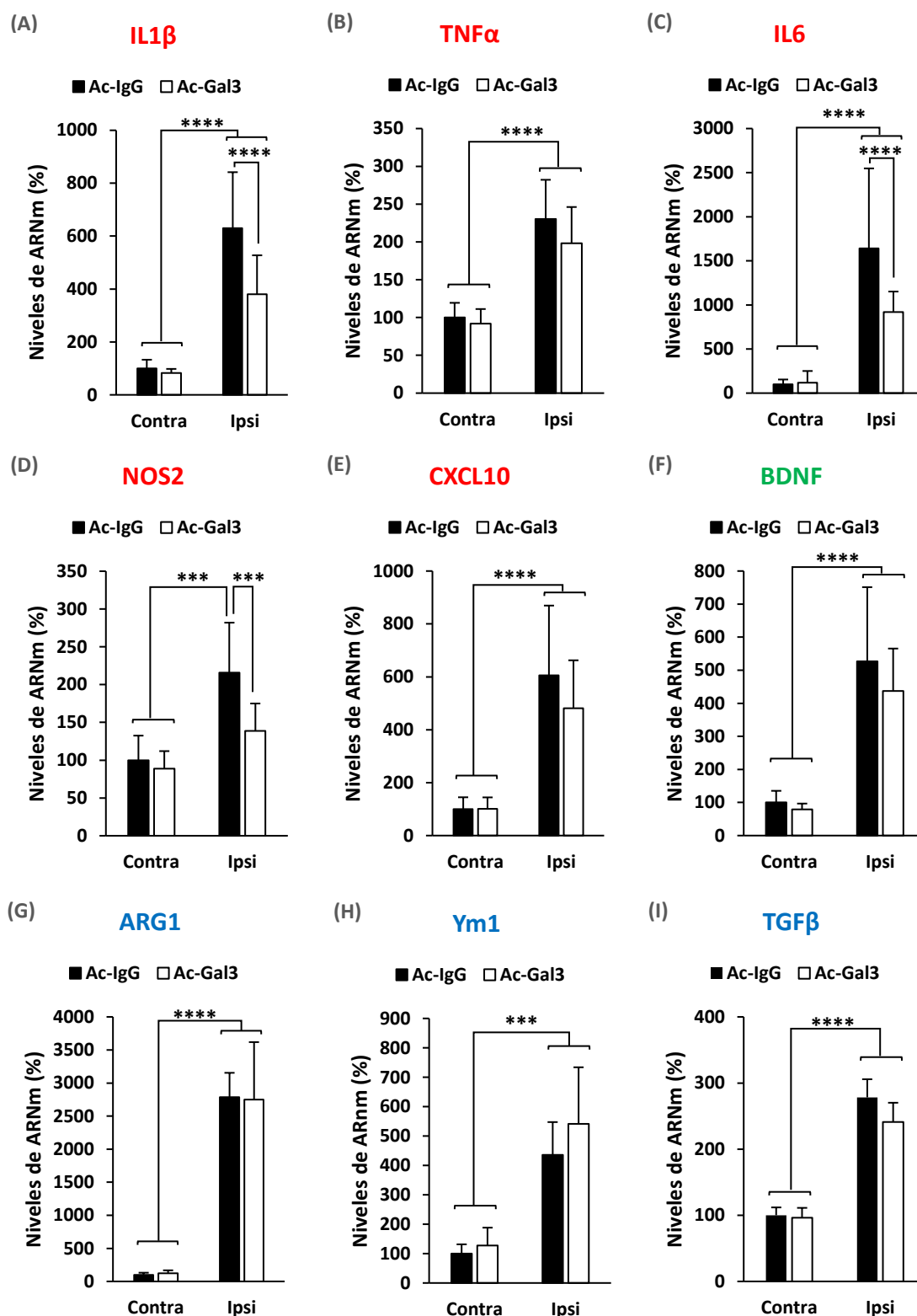


Figura 29. Efecto de la neutralización de la galectina-3 extracelular sobre la respuesta inflamatoria producida por el TBI en cerebro de ratón. RT-PCR para marcadores proinflamatorios (rojo) IL1 $\beta$  (A), TNF $\alpha$  (B), IL6 (C), NOS2 (D) y CXCL10 (E); BDNF (F) (verde); marcadores antiinflamatorios (azul) ARG1 (G), Ym1 (H) y TGF $\beta$  (I). Cuantificación de la expresión génica en el lado contra e ipsi al daño de ratones Ac-IgG y Ac-Gal3, 24 horas después del TBI. Los datos se representan como media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, y son expresados como % respecto al Ac-IgG contralateral. La significación estadística de los datos se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

### 3. LA GALECTINA-3 EXTRACELULAR AUMENTA LA PÉRDIDA NEURONAL POR FAGOCITOSIS MICROGLIAL *IN VITRO*

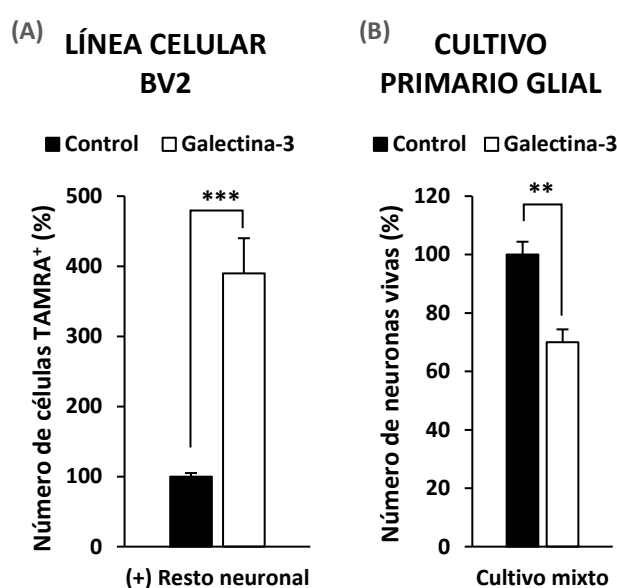
Dado que la galectina-3 se libera al espacio extracelular después de un traumatismo como el TBI y que mediante inmunofluorescencia pudimos observar cómo células microgliales aparentemente rodeaban a neuronas de la capa de células piramidales del hipocampo CA1, nos preguntamos si la galectina-3 presente *in vivo* en el espacio extracelular participaba en la fagocitosis microglial de neuronas.

Para probar nuestra hipótesis, se pretrató la línea celular microglial murina BV2 con galectina-3 recombinante (200 nM) durante 18 horas para evaluar su efecto sobre la fagocitosis de restos neuronales marcados con TAMRA. La cuantificación de los restos neuronales fagocitados por parte de las células BV2 se realizó por citometría de flujo mediante la detección y cuantificación del número de células TAMRA-positivas (Figura 30A). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control. De forma notable, se observó un aumento en la capacidad fagocítica (392%) de las células BV2 pretratadas con galectina-3 (Figura 30A).

Tras este experimento, se decidió analizar la capacidad de la galectina-3 recombinante para inducir la pérdida neuronal en cultivo primario mixto de glía de tejido cortical (85% de neuronas) que pudiera demostrar las diferencias en la supervivencia celular entre ratones WT y KOGal3 con ausencia de galectina-3 o entre ratones tratados con Ac-IgG y tratados con Ac-Gal3 con la galectina-3 extracelular neutralizada. En este caso se procedió de la misma manera que en el caso anterior, tratando un cultivo con galectina-3 recombinante (1  $\mu$ M) durante 96 horas y dejando otro cultivo sin tratamiento alguno como control. La cuantificación de las neuronas vivas se realizó por inmunomarcaje con ioduro de propidio (para identificar las células necróticas) y Hoechst

(para identificar las células sanas o apoptóticas según el estado de la cromatina). Para el recuento se utilizó un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron una reducción en la supervivencia neuronal (30%) después de 96 horas de tratamiento con galectina-3 respecto al cultivo control no tratado (Figura 30B).

Esto demostró el papel *in vitro* de la galectina-3 extracelular en la capacidad fagocítica microglial aumentando o facilitando la fagocitosis de neuronas vivas.



**Figura 30. La galectina-3 extracelular aumenta la pérdida neuronal por fagocitosis microglial *in vitro*.** (A) Análisis de la capacidad fagocítica de las células microgliales BV2 después de 2 horas de incubación con restos neuronales, en células control y células preincubadas con galectina-3 recombinante (200 nM) durante 18 horas. (B) Cuantificación de la pérdida neuronal en cultivos primarios corticales mixtos glía/neuronas de rata neonatal, control y tratados con galectina-3 recombinante (1  $\mu$ M) durante 96 horas. Los datos se representaron como media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes, y son expresados en como % respecto al control. La significación estadística de los datos se analizó usando un test t de Student de 2 colas. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

## DISCUSIÓN





El TBI es una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo occidental (Das *et al.*, 2012). Una lesión traumática cerebral desencadena una respuesta neuroinflamatoria muy potente que es responsable de muchos de los efectos nocivos secundarios a la lesión inicial (Corps *et al.*, 2015). La lesión secundaria, es decir, la pérdida de células neuronales asociada a la respuesta neuroinflamatoria, desencadenada por la contusión inicial, contribuye a un empeoramiento del pronóstico neurológico de los pacientes (Hellewell *et al.*, 2016). Es importante destacar que se ha demostrado que tanto TLR2 como TLR4 desempeñan un papel clave durante esta respuesta neuroinflamatoria temprana en diversos modelos experimentales de TBI, y que la inhibición de este receptor promueve un mejor pronóstico neurológico (Park *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013; Hayward *et al.*, 2014; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Por lo tanto, identificar los factores que regulan dicho receptor y con ello la respuesta neuroinflamatoria podría dar a conocer posibles dianas terapéuticas y así generar nuevos candidatos terapéuticos que ayuden a mejorar el pronóstico neurológico de los pacientes.

## 1. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE LA GALECTINA-3 EN EL CEREBRO DE RATÓN EN NUESTRO MODELO DE TBI

Poco después de una lesión en el cerebro aumenta la expresión de varias proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria, incluida la lectina galectina-3 (Natale *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2010; Byrnes *et al.*, 2011; Pajooohesh-Ganji *et al.*, 2012; Boza-Serrano *et al.*, 2014; Burguillos *et al.*, 2015; Mostacada *et al.*, 2015). De hecho, en estudios previos en TBI se ha descrito la liberación de la galectina-3 al plasma (Shan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016).

En nuestra investigación en un modelo murino de TBI detectamos un aumento drástico en la expresión a nivel de ARNm de la galectina-3 tanto en corteza como en hipocampo como consecuencia del daño producido por el TBI. Esta inducción solo se pudo observar a las 24 horas después del impacto cortical inicial y en el lado ipsilateral al daño, no habiendo afectación alguna en el lado contralateral. Además, esta expresión inducida de la galectina-3 corresponde casi exclusivamente a la microglía activada ameboide (células Iba1-positivas o TMEM119-positivas (Bennett *et al.*, 2016)), presente exclusivamente en las muestras ipsilaterales 24 horas después del TBI.

En estas condiciones, se observa un claro marcaje galectina-3 positivo difuso reminiscente del marcaje de proteínas celulares, por lo que podría ser galectina-3 liberada al espacio extracelular por dicha microglía. Recientemente, nuestro grupo ha realizado un estudio, en un modelo de isquemia cerebral global que imita el daño cerebral causado por un paro cardíaco, donde observan que la galectina-3 es liberada por la microglía activada en respuesta a estímulos proinflamatorios y, lo que es más importante, actúa como un ligando paracrino endógeno del receptor TLR4 y con ello como inmunomodulador central de la respuesta inmune microglial (Burguillos *et al.*,

2015). Además, la BHE se encuentra muy alterada tras el TBI (Alves, 2014), por lo que puede esperarse una fuga sustancial de esta galectina-3 del parénquima cerebral a líquidos corporales (Shan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016). Por ello, analizamos el contenido de esta proteína en el LCR de nuestros ratones tras el TBI y confirmamos la presencia de cantidades significativas de la galectina-3 en ratones 24 horas después del impacto.

Por otro lado, la mayoría de las neuronas (células NeuN-positivas) no expresan galectina-3. Sin embargo, ciertos tipos de células neuronales presentan una leve expresión punteada galectina-3 positiva. La expresión neuronal de la galectina-3 ya se ha descrito en cultivos de neuronas del DRG del ratón (Pesheva *et al.*, 2000) y también en el SNC en desarrollo y adulto en un subconjunto de neuronas del DRG en los ganglios espinales (Dodd *et al.*, 1986). Recientemente, se ha descrito la presencia de la galectina-3 en neuronas de la corteza cerebral y otros núcleos subcorticales en el hipotálamo y el tronco encefálico en ratas sanas (Yoo *et al.*, 2017). En nuestro modelo de TBI, la expresión neuronal de la galectina-3 se observa en las células neuronales de la capa piramidal del hipocampo, aunque también se encuentra en neuronas corticales.

Respecto a los astrocitos se ha demostrado que pueden expresar altos niveles de galectina-3 cinco días después de una lesión cortical realizada por una incisión (Sirko *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro modelo de TBI no detectamos prácticamente ningún astrocito (células GFAP-positivas) con marcaje galectina-3 positivo dentro de las primeras 24 horas después del TBI.

Por lo tanto, podemos concluir que la microglía activada representa el principal fenotipo responsable de la expresión de galectina-3 en nuestro modelo de TBI.

## 2. LA GALECTINA-3 COMO INMUNOMODULADOR EN EL TBI

La galectina-3 liberada al espacio extracelular tras el TBI podría interaccionar con el receptor TLR4 y desencadenar la respuesta inmune microglial y con ello la respuesta neuroinflamatoria temprana dependiente de este receptor y producida o secundaria a la lesión inicial del TBI (Park *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013; Hayward *et al.*, 2014; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Esta neuroinflamación se cree que puede jugar un papel relevante en la progresión de la neurodegeneración (Hellewell *et al.*, 2016). Por consiguiente, la modificación de la expresión o disponibilidad de la galectina-3 podría impedir o reducir la progresión de la neurodegeneración asociada al daño inicial del TBI. Ya hay estudios en los que se ha relacionado la inhibición o ausencia de la expresión de la galectina-3 con una neuroprotección en procesos de neurodegeneración asociados a neuroinflamación (Burguillos *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016; Prins *et al.*, 2016). Es de destacar, que dependiendo de la ubicación, intracelular o extracelular, algunos autores le dan un papel a la galectina-3 diferente a la inflamación en alguno de estos procesos (MacKinnon *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2010). Por ello, para discernir en nuestro modelo de TBI entre el papel intracelular y extracelular de la galectina-3, utilizamos dos tipos de animales: ratones modificados genéticamente (ratones KOGal3) con ausencia total de la galectina-3 por delección del gen, y ratones a los que se le administra un anticuerpo neutralizante (ratones Ac-Gal3) contra la galectina-3 extracelular (Thaney *et al.*, 2017).

### 2.1. LA GALECTINA-3 COMO INDUCTOR DE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

Recientemente, como ya hemos comentado, nuestro grupo ha descrito un nuevo papel para la galectina-3 liberada al medio extracelular como un ligando endógeno del

receptor TLR4, participando activamente en la respuesta neuroinflamatoria dependiente de este receptor (Burguillos *et al.*, 2015). En nuestro modelo de TBI hemos podido demostrar una liberación de la galectina-3, aparentemente por la microglía reactiva. Por ello, como siguiente paso nos planteamos dilucidar si, efectivamente, la liberación de la galectina-3 al espacio extracelular en respuesta a TBI conlleva interacción con el receptor TLR4. Para ello, procedimos a un estudio de inmunoprecipitación a partir de muestras cerebrales obtenidas 24 horas después de la lesión. Nuestro estudio demuestra que la galectina-3 liberada al medio extracelular interacciona con el receptor TLR4 en respuesta al TBI, sugiriendo, por tanto, que la galectina-3 podría jugar un papel relevante en la respuesta inmune microglial desencadenada en las primeras 24 horas después del TBI, activando dichas células a través de su interacción con el receptor TLR4. Esta hipótesis está avalada por nuestro estudio *in vivo* asociado a la neutralización de la galectina-3 extracelular mediante anticuerpos de neutralización, y, con ello, a la interacción con el receptor TLR4. En estas condiciones observamos una disminución en el grado de activación de la microglía hipocampal 24 horas después del TBI, lo que nos permite concluir que la galectina-3 liberada al espacio extracelular por parte de la microglía interacciona con el receptor TLR4, contribuyendo de este modo a la amplificación de la respuesta inmune cerebral.

Por otro lado, quisimos analizar la subpoblación microglial *Rod* implicada en la respuesta proinflamatoria en dos modelos experimentales diferentes de TBI (Ziebell *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2014). Históricamente, esta microglía se ha descrito como células con un soma en forma alargada, o de “salchicha”, con procesos largos y delgados, que se alinean junto a las neuronas y de forma adyacente a procesos neuronales (Taylor *et al.*, 2014). En nuestro modelo de TBI, la presencia de este tipo microglial aumenta en

muestras de tejido de corteza e hipocampo ipsilateral de ratones a las 2 horas después del TBI, sugiriendo un aumento de la respuesta proinflamatoria temprana como resultado del daño producido por el impacto. La ausencia de la galectina-3 en los ratones KOGal3 afecta a este grupo celular disminuyendo la presencia de la microglía *Rod*, apoyando así el papel de la galectina-3 en la activación microglial y respuesta inflamatoria inducida tras el modelo de TBI.

Además, en nuestro modelo de TBI, observamos la presencia de microglía reactiva con altos niveles de expresión de galectina-3 interaccionando con neuronas de la degenerada capa de células piramidales del hipocampo, la cual es altamente sensible al traumatismo cerebral. Se ha demostrado que la galectina-3 extracelular se une al receptor microglial fagocítico MerTK actuando ésta como opsonina (Nomura *et al.*, 2017) y ejerciendo una señal en neuronas, estimulando así la fagocitosis microglial de dichas neuronas (Neher *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2016). La microglía activada podría así estar eliminando las neuronas muertas o seriamente dañadas, e incluso fagocitando neuronas estresadas pero viables, contribuyendo a la pérdida neuronal durante la progresión de la inflamación y la neurodegeneración (Fricker *et al.*, 2012; Neher *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2016). Este último caso es un proceso conocido como fagoptosis, e implicado en procesos de neurodegeneración asociada a estrés celular por un proceso inflamatorio. En este tipo de condiciones las neuronas pueden llegar a exponer en su superficie, por translocación reversible, residuos de fosfatidilserina. Esto marca a la neurona para su eliminación selectiva por la microglía activada. Uno de los receptores microgliales que media esta fagoptosis es MerTK, y una de las opsoninas es la galectina-3 (Caberoy *et al.*, 2012; Brown y Neher, 2014). Consideramos muy relevante profundizar en el papel potencial de la galectina-3

tanto en los procesos de fagocitosis como de fagoptosis bajo condiciones de trauma cerebral. Para ello, analizamos en primer lugar el efecto de la galectina-3 recombinante en un cultivo de células microgliales BV2 incubadas en presencia de restos celulares marcados con TAMRA. Bajo estas condiciones, el efecto positivo de la adición exógena de galectina-3 sobre la fagocitosis de restos celulares fue notable. Con objeto de valorar el posible papel de la galectina-3 en el proceso de fagoptosis, preparamos cultivos primarios mixtos. En estas condiciones, el grupo de Guy Brown y colaboradores han demostrado que la microglía fagocita un número limitado pero significativo de neuronas viables (Fricker *et al.*, 2012; Neher *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014). Bajo estas condiciones, comprobamos como la adición exógena de galectina-3 conllevó a una disminución significativa de la supervivencia neuronal, demostrando de este modo su implicación directa en procesos de fagoptosis. Este hallazgo puede ser, sin duda, relevante en procesos de trauma cerebral que inherentemente van asociados a un alto estrés celular junto con una elevada activación microglial y la consiguiente liberación de galectina-3 en el parénquima cerebral.

## 2.2. LA GALECTINA-3 COMO INDUCTOR DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

El TBI induce un ambiente complejo donde una respuesta inflamatoria mixta se desarrolla de forma temprana después de la lesión (Kim *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Morganti *et al.*, 2016). Esta respuesta inflamatoria es modulada por la activación de TLR4 (Ahmad *et al.*, 2013; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). En nuestro modelo de TBI, hemos podido demostrar la interacción directa entre la galectina-3 liberada y el receptor TLR4, que unido al estudio *in vivo* asociado al uso de anticuerpos de neutralización nos permiten sugerir un papel relevante de la galectina-3 como activador

microglial e inductor de la respuesta inflamatoria dependiente de este receptor (Burguillos *et al.*, 2015).

Por todo ello, era obligado el estudio del estado neuroinflamatorio presente en el cerebro de ratón tras el TBI, tanto en ausencia de la galectina-3 como con la neutralización de la galectina-3 extracelular. Para ello se analizó por RT-PCR los niveles de ARNm de diferentes marcadores proinflamatorios como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, NOS2 y CXCL10, y marcadores antiinflamatorios como ARG1, Ym1 y TGF $\beta$ . Inesperadamente, la ausencia de galectina-3 no disminuye la respuesta proinflamatoria desencadenada en el lado ipsilateral al daño. Sin embargo, debe destacarse que en el lado ipsilateral del hipocampo, a las 24 horas después del traumatismo, se puede observar un aumento drástico en los marcadores antiinflamatorios ARG1 y Ym1, siendo en el caso de ARG1 mayor en ausencia de la galectina-3. En el caso de la neutralización de la galectina-3 extracelular sí encontramos una disminución en la expresión de los marcadores proinflamatorios IL1 $\beta$ , IL6 y NOS2, apoyando la tesis de la implicación de la galectina-3 liberada en nuestro modelo de TBI como ligando del receptor TLR4 y, por lo tanto, como inductor de la respuesta inflamatoria dependiente de este receptor.

Teniendo en cuenta que la disminución del estado proinflamatorio y la facilitación del estado antiinflamatorio puede ser una estrategia prometedora para promover la reparación de los tejidos en condiciones de trauma cerebral, la inhibición farmacológica de la galectina-3 podría ser una posible diana terapéutica. Además, el estado antiinflamatorio se asocia con la liberación de factores tróficos. En nuestro modelo de TBI encontramos una fuerte inducción de la expresión del factor BDNF, el cual puede ser sintetizado no solo en neuronas sino también en astrocitos (Parpura *et al.*, 2010) y microglía (Ferrini *et al.*, 2013). En nuestro modelo de TBI, encontramos una



clara sobreexpresión de BDNF tanto en corteza como en hipocampo a las 24 horas después del impacto, lo que respalda un posible papel trófico de esta neurotrofina después de las afecciones neurotraumatológicas (Hicks *et al.*, 1997; Hicks *et al.*, 1999). El hecho de que esta sobreexpresión sea mayor en ausencia de la galectina-3 sugiere de nuevo que la inhibición o modulación terapéutica de la galectina-3 ayudaría a mejorar el pronóstico neurológico tras el TBI. Además, se ha demostrado que pequeñas moléculas de miméticos de BDNF se unen y activan específicamente el receptor tipo quinasa B de tropomiosina (TrkB), mejorando el aprendizaje motor después del TBI (Butenschön *et al.*, 2016) y ejerciendo un efecto neuroprotector en adultos (Massa *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014) y en ratones recién nacidos (Chen *et al.*, 2015). Podemos concluir que el aumento de la producción endógena de neurotrofinas como el BDNF, mediante la modulación externa de la acción intracelular de la galectina-3, y la administración exógena de BDNF, ayudarían a la recuperación neurológica.

La aparente discordancia de resultados en términos de marcadores inflamatorios se puede explicar por la diferencia entre una deficiencia genética constitutiva total de galectina-3, que afecta a todos los tipos celulares y procesos intracelulares donde se encuentre implicada la galectina-3, y un modelo que usa un anticuerpo neutralizante contra la galectina-3 que afecta solo a la proteína liberada, y por tanto exclusivamente al papel extracelular de la proteína. Estas discrepancias entre los diferentes efectos sobre la respuesta inflamatoria resaltan las complejas interacciones celulares dependientes de esta proteína que regulan y modulan la respuesta inmune en el cerebro, y puede ser una consecuencia del gran abanico de funciones que desempeña esta proteína dependiendo de dónde se encuentra en la célula y el tipo de célula en el que se expresa.

### 3. LA MODULACIÓN DE LA GALECTINA-3 COMO NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL TBI

El hecho de que la galectina-3 sea liberada al espacio extracelular en situaciones de TBI (Shan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016), aparentemente por la microglía reactiva, y que esta galectina-3 actúe como ligando de TLR4 promoviendo la activación microglial (Burguillos *et al.*, 2015), podría explicar el papel central de la galectina-3 liberada al espacio extracelular en la regulación de la respuesta inmune cerebral. Además, sugiere a la microglía como grupo celular responsable de la respuesta inflamatoria desencadenada tras el TBI. Ello hace suponer que la modulación de la interacción entre la galectina-3 y TLR4, ya sea por la ausencia o neutralización de la galectina-3, ayudaría a reducir la activación microglial, y, con ello, la respuesta neuroinflamatoria desencadenada en nuestro modelo de TBI, la cual es responsable de la progresión de la neurodegeneración (Hellewell *et al.*, 2016).

Debido a que el efecto que ejerce esta proteína puede variar según su ubicación, como se ha visto en su papel sobre la respuesta inflamatoria, analizamos el efecto sobre la población neuronal en ratones KOGal3, con ausencia total en la expresión de la galectina-3, y ratones Ac-Gal3, con la proteína liberada al espacio extracelular neutralizada por anticuerpos de neutralización (Thaney *et al.*, 2017).

Para ello, analizamos la pérdida neuronal por inmunohistoquímica, dando como resultado que la ausencia de la galectina-3 en los ratones KOGal3 ejerce una acción neuroprotectora contra el daño inducido a las 24 horas después por el TBI, tanto a nivel cortical como hipocampal. Además, a largo plazo (21 días), se analizó el volumen de daño evaluando una serie completa de secciones procesadas con azul de toluidina, dando como resultado el mismo efecto neuroprotector encontrado a 24 horas tras el TBI. Esta neuroprotección observada a largo plazo apoya lo explicado anteriormente sobre el

efecto perjudicial de la respuesta neuroinflamatoria temprana desencadenada por el traumatismo inicial del TBI, la cual es responsable de la progresión de la neurodegeneración tras el TBI (Corps *et al.*, 2015; Hellewell *et al.*, 2016). El análisis en condiciones de neutralización de la galectina-3 extracelular proporcionó un marco de neuroprotección frente al TBI similar al anterior con ausencia total de galectina-3.

Aparte de la posible implicación de la galectina-3 sobre la respuesta inflamatoria y activación microglial desencadenada a través de la activación del receptor TLR4 en modelos de TBI (Ahmad *et al.*, 2013; Laird *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), hemos sugerido en nuestro modelo de TBI que la galectina-3 podría estar actuando como opsonina uniéndose al receptor microglial fagocítico MerTK (Caberoy *et al.*, 2012; Nomura *et al.*, 2017). De este modo, la presencia de la galectina-3 podría estar facilitando la fagocitosis microglial de neuronas estresadas por el proceso inflamatorio producido por el TBI (Caberoy *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2014). De hecho, en nuestros estudios *in vitro* pudimos demostrar como la presencia de galectina-3 exógena facilitaba la fagocitosis de restos neuronales y la fagoptosis de neuronas vivas. De este modo, se podría explicar también el aumento en la supervivencia neuronal en los casos de ausencia total de la galectina-3 o neutralización de la galectina-3 liberada.

#### 4. LA GALECTINA-3 COMO DIANA TERAPÉUTICA FRENTE AL TBI

Todos estos resultados respaldan la hipótesis del papel de la galectina-3 sobre la activación microglial y la respuesta neuroinflamatoria inducida por el daño inicial del TBI y el consiguiente efecto sobre la pérdida neuronal asociada.

Nuestros resultados indican que la inducción de la liberación de la galectina-3 podría actuar como una alarmina en condiciones de daño cerebral traumático desencadenando la respuesta inmune en el SNC, la activación microglial y una fuerte respuesta proinflamatoria. Nuestros datos confirman la interacción entre esta galectina-3 y el receptor TLR4, cuya activación podría ser responsable de la neuroinflamación desencadenada en nuestro modelo murino de TBI y por lo tanto de la progresión de la neurodegeneración asociada. Además, la galectina-3 extracelular podría interaccionar, al menos, con el receptor microglial MerTK actuando como opsonina y facilitando la fagocitosis de neuronas por parte de la microglía reactiva, contribuyendo de nuevo a la pérdida neuronal y neurodegeneración. Por otro lado, nuestros datos apoyan que la galectina-3 intracelular juega un importante papel en la regulación del estado antiinflamatorio y de la expresión de BDNF inducida por el TBI, pudiendo ayudar a la mejora del daño neuronal y pronóstico neurológico tras el TBI.

Por lo tanto, terapias dirigidas a modular la expresión o disponibilidad de la galectina-3 dentro de las primeras 24 horas después del TBI podrían tener un efecto potencialmente positivo en los pacientes modulando la respuesta inmune desencadenada tras el TBI, y con ello disminuyendo el avance y secuelas neuronales asociadas, mejorando así el pronóstico neurológico de dichos pacientes.

## CONCLUSIONES / CONCLUDING REMARKS



Durante el transcurso de este proyecto, hemos establecido las siguientes conclusiones referentes al papel de la galectina-3 en el modelo murino de TBI:

1. La **galectina-3 se induce** fuertemente en la corteza y el hipocampo a las 24 horas después del impacto y exclusivamente en el lado ipsilateral al daño.
2. La **microglía reactiva** aparece en corteza e hipocampo a las 24 horas después del impacto y exclusivamente en el lado ipsilateral al daño. Esta microglía reactiva se caracteriza por expresar **altos niveles de galectina-3**, siendo el principal grupo celular responsable de la expresión de la misma. Además, esta microglía reactiva se encuentra invadiendo la capa degenerada de neuronas piramidales del hipocampo.
3. Las **neuronas** de la capa piramidal del hipocampo presentan un leve y característico **marcaje punteado positivo para galectina-3** en los ratones controles y en los ratones con TBI. Sin embargo, tras 24 horas después del TBI este marcaje se presenta alterado y disminuido en el lado ipsilateral debido a la degeneración producida en esta capa tras el TBI. Las **neuronas corticales** también presentan este tipo de marcaje
4. La **galectina-3 es liberada al medio extracelular** en respuesta al TBI evidenciado por la presencia de la misma en el líquido cefalorraquídeo 24 horas tras el impacto.
5. La **galectina-3 liberada** al espacio extracelular **interacciona con el receptor TLR4**, pudiendo de este modo participar activamente en la inducción de la respuesta inmune dependiente de TLR4 desencadenada tras el TBI y, por tanto, en la neurodegeneración asociada.
6. La **ausencia de la proteína galectina-3 disminuye** la presencia de **microglía Rod** en la corteza y el hipocampo a las 2 horas después del impacto, avalado por el **aumento** de la expresión de marcadores **antiinflamatorios (ARG-1 y Ym1)** y de **BDNF**.

7. La **inhibición de la galectina-3 extracelular** mediante el uso de anticuerpos neutralizantes **disminuye la activación microglial** en el hipocampo a las 24 horas después del impacto, y la respuesta inflamatoria asociada en términos de expresión de los **marcadores proinflamatorios (IL1 $\beta$ , IL6 y NOS2)**.
8. Tanto la **ausencia total de la proteína galectina-3 como la neutralización de la galectina-3 extracelular** producen un efecto **neuroprotector** frente al TBI en corteza e hipocampo a las 24 horas después del impacto. La ausencia total de la proteína galectina-3 produce incluso neuroprotección a largo plazo (21 días).
9. El papel de la **galectina-3 como ligando del receptor TLR4** podría justificar la **disminución de la respuesta inflamatoria asociada a la activación microglial y la consiguiente neuroprotección** observada frente al TBI en ratones con ausencia de la galectina-3 o ratones tratados con anticuerpos neutralizante de la galectina-3.
10. Además, la **galectina-3 exógena aumenta la capacidad fagoptótica de la microglía y con ello la muerte neuronal (*in vitro*)**.
11. La **modificación de la expresión y/o la disponibilidad de la proteína galectina-3** podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento o impedimento de la **progresión del daño neuronal asociado a la inflamación producida por un daño cerebral traumático**.



During the course of this project, we have established the following conclusions regarding the study of the role of galectin-3 in the TBI murine model:

1. **Galectin-3** is **overexpressed** in the cortex and hippocampus 24 hours after impact and exclusively on the ipsilateral side.
2. **Reactive microglia** appear in the cortex and hippocampus 24 hours after impact and exclusively on the ipsilateral side. This reactive microglia express **high levels of galectin-3**, being the main cellular phenotype responsible for the expression of this lectin. In addition, reactive microglia invade the degenerated layer of pyramidal neurons of the hippocampus.
3. **Hippocampal pyramidal cell layer** has a mild and characteristic **positive galectin-3 punctate labelling** in control- and TBI-mice. However, this labelling appears altered and decreased on the ipsilateral side 24h after trauma due to the degeneration produced in this layer. Cortical neurons also present this type of punctate labelling.
4. **Galectin-3 is released to the extracellular space** in response to TBI as evidenced by its presence in the cerebrospinal fluid 24 hours after impact.
5. **Galectin-3 released** to the extracellular space **interacts with the TLR4** receptor, thus being able to participate actively in the induction of the TLR4-dependent immune response triggered after the TBI, and, therefore, in the associated neurodegeneration.
6. **Absence of galectin-3 protein** leads to a **decrease of Rod microglia** in cortex and hippocampus 2 hours after impact, along with an **increase of** the expression of the **antiinflammatory markers (ARG1 and Ym1) and BDNF**.

7. **Inhibition of extracellular galectin-3** by neutralizing antibodies **decreases microglia activation** in the hippocampus 24 hours after impact, along with a **decrease of the expression of the proinflammatory markers (IL1 $\beta$ , IL6 and NOS2)**.
8. **Total absence of galectin-3 protein or inhibition of extracellular galectin-3** produce a **neuroprotective** effect against TBI in the cortex and hippocampus 24 hours after impact. The total absence of the galectin-3 protein even produces long-term neuroprotection (21 days).
9. **The role of galectin-3 as endogenous TLR4 ligand** could explain **the decrease in the microglial activation and associated inflammatory response and**, consequently, the **neuroprotection** observed against TBI in KOGal3-mice and Ac-Gal3-mice.
10. Besides, **exogenous galectin-3 increases microglia-associated phagoptosis and hence neuronal death (*in vitro*)**.
11. **Targeting the expression and/or availability of galectin-3** could be a new therapeutic target for treating or slowing down the progression of the neuronal damage associated with inflammation produced by traumatic brain injury.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Abiega, O. *et al.* (2016) «Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling», *PLOS Biology*. Editado por B. A. Barres. Public Library of Science, 14(5), p. e1002466. doi: 10.1371/journal.pbio.1002466.
2. Ahmad, A. *et al.* (2013) «Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice.», *PloS one*. Editado por K. M. Dhandapani, 8(3), p. e57208. doi: 10.1371/journal.pone.0057208.
3. Ahmed, H. y Alsadek, D. M. M. (2015) «Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis», *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 9, p. CMO.S29462. doi: 10.4137/CMO.S29462.
4. Alirezaei, M. *et al.* (2008) «Disruption of neuronal autophagy by infected microglia results in neurodegeneration.», *PloS one*. Editado por X.-J. Li, 3(8), p. e2906. doi: 10.1371/journal.pone.0002906.
5. Alliot, F., Godin, I. y Pessac, B. (1999) «Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain.», *Brain research. Developmental brain research*, 117(2), pp. 145-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567732>.
6. Alves, J. L. (2014) «Blood-brain barrier and traumatic brain injury», *Journal of Neuroscience Research*, 92(2), pp. 141-147. doi: 10.1002/jnr.23300.
7. Bennett, M. L. *et al.* (2016) «New tools for studying microglia in the mouse and human CNS.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), pp. E1738-46. doi: 10.1073/pnas.1525528113.
8. Bernardes, E. S. *et al.* (2006) «Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity.», *The American journal of pathology*, 168(6), pp. 1910-20. doi: 10.2353/ajpath.2006.050636.
9. Bianchi, M. E. (2007) «DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger», *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), pp. 1-5. doi: 10.1189/jlb.0306164.
10. Biber, K. *et al.* (2007) «Neuronal “On” and “Off” signals control microglia.», *Trends in neurosciences*. Elsevier, 30(11), pp. 596-602. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.007.
11. Blanchard, H. *et al.* (2014) «Galectin-3 inhibitors: a patent review (2008-present).», *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(10), pp. 1053-65. doi: 10.1517/13543776.2014.947961.
12. Bodea, L.-G. *et al.* (2014) «Neurodegeneration by Activation of the Microglial Complement-Phagosome Pathway», *Journal of Neuroscience*, 34(25), pp. 8546-8556. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5002-13.2014.
13. Boza-Serrano, A. *et al.* (2014) «The role of Galectin-3 in  $\alpha$ -synuclein-induced microglial activation.», *Acta neuropathologica communications*, 2(1), p. 156. doi: 10.1186/s40478-014-0156-0.
14. Brazinova, A. *et al.* (2015) «Factors that may improve outcomes of early traumatic brain injury care: prospective multicenter study in Austria.», *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*, 23(1), p. 53. doi: 10.1186/s13049-015-0133-z.
15. Breuilh, L. *et al.* (2007) «Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells.», *Infection and immunity*, 75(11), pp. 5148-57. doi: 10.1128/IAI.02006-06.
16. Brown, G. C. y Neher, J. J. (2014) «Microglial phagocytosis of live neurons.», *Nature reviews. Neuroscience*, 15(4), pp. 209-16. doi: 10.1038/nrn3710.
17. Buchanan, M. M. *et al.* (2010) «Toll-like receptor 4 in CNS pathologies», *Journal of Neurochemistry*, 114(1), p. no-no. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06736.x.
18. Burguillos, M. A. *et al.* (2011) «Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity.», *Nature*, 472(7343), pp. 319-24. doi: 10.1038/nature09788.
19. Burguillos, M. A. *et al.* (2015) «Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation.», *Cell reports*, 10(9), pp. 1626-1638. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.012.
20. Butenschön, J. *et al.* (2016) «PSA-NCAM positive neural progenitors stably expressing BDNF promote functional recovery in a mouse model of spinal cord injury», *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), p. 11. doi: 10.1186/s13287-015-0268-x.
21. Butovsky, O. *et al.* (2014) «Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 131-143. doi: 10.1038/nn.3599.
22. Butovsky, O. *et al.* (2015) «Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice», *Annals of Neurology*. Wiley-Blackwell, 77(1), pp. 75-99. doi: 10.1002/ana.24304.

23. Byrnes, K. R. *et al.* (2011) «Delayed inflammatory mRNA and protein expression after spinal cord injury», *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), p. 130. doi: 10.1186/1742-2094-8-130.
24. Caberoy, N. B. *et al.* (2012) «Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal.», *Journal of cellular physiology*, 227(2), pp. 401-7. doi: 10.1002/jcp.22955.
25. Cartier, N. *et al.* (2014) «The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target?», *Acta Neuropathologica*, 128(3), pp. 363-380. doi: 10.1007/s00401-014-1330-y.
26. Caso, J. R. *et al.* (2007) «Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Brain Damage and Inflammation After Experimental Stroke», *Circulation*, 115(12), pp. 1599-1608. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.603431.
27. Chan, W. Y., Kohsaka, S. y Rezaie, P. (2007) «The origin and cell lineage of microglia: new concepts.», *Brain research reviews*, 53(2), pp. 344-54. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.002.
28. Chen, G. Y. y Nuñez, G. (2010) «Sterile inflammation: sensing and reacting to damage», *Nature Reviews Immunology*, 10(12), pp. 826-837. doi: 10.1038/nri2873.
29. Chen, H. *et al.* (2014) «Glycobiology of the Nervous System», 9, pp. 517-542. doi: 10.1007/978-1-4939-1154-7.
30. Chen, L. *et al.* (2015) «The Small-Molecule TrkB Agonist 7, 8-Dihydroxyflavone Decreases Hippocampal Newborn Neuron Death After Traumatic Brain Injury», *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 74(6), pp. 557-567. doi: 10.1097/NEN.0000000000000199.
31. Cheng, X. *et al.* (2016) «Galectin-3 causes enteric neuronal loss in mice after left sided permanent middle cerebral artery occlusion, a model of stroke», *Scientific Reports*, 6(1), p. 32893. doi: 10.1038/srep32893.
32. Corps, K. N., Roth, T. L. y McGavern, D. B. (2015) «Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury.», *JAMA neurology*, 72(3), pp. 355-62. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3558.
33. Dagher, S. F., Wang, J. L. y Patterson, R. J. (1995) «Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), pp. 1213-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7862663>.
34. Das, M., Mohapatra, S. y Mohapatra, S. S. (2012) «New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury.», *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p. 236. doi: 10.1186/1742-2094-9-236.
35. Davalos, D. *et al.* (2005) «ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 8(6), pp. 752-758. doi: 10.1038/nn1472.
36. David, S. y Kroner, A. (2011) «Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury.», *Nature reviews. Neuroscience*, 12(7), pp. 388-99. doi: 10.1038/nrn3053.
37. Deczkowska, A. *et al.* (2017) «Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner.», *Nature communications*, 8(1), p. 717. doi: 10.1038/s41467-017-00769-0.
38. Deczkowska, A. *et al.* (2018) «Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration.», *Cell*, 173(5), pp. 1073-1081. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
39. Demetriou, M. *et al.* (2001) «Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mga5 N-glycosylation», *Nature*, 409(6821), pp. 733-739. doi: 10.1038/35055582.
40. Demotte, N. *et al.* (2008) «Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes.», *Immunity*, 28(3), pp. 414-24. doi: 10.1016/j.immuni.2008.01.011.
41. Dennis, J. W. *et al.* (2009) «Adaptive Regulation at the Cell Surface by N -Glycosylation», *Traffic*, 10(11), pp. 1569-1578. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00981.x.
42. Dodd, J. y Jessell, T. M. (1986) «Cell surface glycoconjugates and carbohydrate-binding proteins: possible recognition signals in sensory neurone development.», *The Journal of experimental biology*, 124, pp. 225-38. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3760766>.
43. Dumić, J., Dabelić, S. y Flögel, M. (2006) «Galectin-3: An open-ended story», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Elsevier, 1760(4), pp. 616-635. doi: 10.1016/J.BBAGEN.2005.12.020.
44. Ekdahl, C. T., Kokaia, Z. y Lindvall, O. (2009) «Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia», *Neuroscience*, 158(3), pp. 1021-1029. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.052.
45. Elad-Sfadia, G. *et al.* (2004) «Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity.», *The Journal of biological chemistry*, 279(33), pp. 34922-30. doi: 10.1074/jbc.M312697200.
46. Fang, H. *et al.* (2013) «Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury», *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), p. 794. doi: 10.1186/1742-2094-10-27.

47. Fellner, L. *et al.* (2013) «Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia.», *Glia*, 61(3), pp. 349-60. doi: 10.1002/glia.22437.
48. Fermino, M. L. *et al.* (2011) «LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation.», *PLoS one*. Editado por J.-P. Gorvel, 6(10), p. e26004. doi: 10.1371/journal.pone.0026004.
49. Ferrini, F. y De Koninck, Y. (2013) «Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling.», *Neural plasticity*, 2013, p. 429815. doi: 10.1155/2013/429815.
50. Fricker, M., Oliva-Martín, M. J. y Brown, G. C. (2012) «Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A $\beta$  is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling.», *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p. 196. doi: 10.1186/1742-2094-9-196.
51. Friedman, B. A. *et al.* (2018) «Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models.», *Cell reports*. Elsevier, 22(3), pp. 832-847. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066.
52. Fukumori, T. *et al.* (2003) «CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis.», *Cancer research*, 63(23), pp. 8302-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678989>.
53. Funasaka, T., Raz, A. y Nangia-Makker, P. (2014) «Galectin-3 in angiogenesis and metastasis», *Glycobiology*, 24(10), pp. 886-891. doi: 10.1093/glycob/cwu086.
54. Gautier, E. L. *et al.* (2012) «Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages», *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 1118-1128. doi: 10.1038/ni.2419.
55. Gerber, L. M. *et al.* (2013) «Marked reduction in mortality in patients with severe traumatic brain injury», *Journal of Neurosurgery*, 119(6), pp. 1583-1590. doi: 10.3171/2013.8.JNS13276.
56. Ghajar, J. (2000) «Traumatic brain injury.», *Lancet (London, England)*, 356(9233), pp. 923-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02689-1.
57. Ginhoux, F. *et al.* (2010) «Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.», *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), pp. 841-5. doi: 10.1126/science.1194637.
58. Ginhoux, F. y Prinz, M. (2015) «Origin of microglia: current concepts and past controversies.», *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7(8), p. a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
59. Gong, H. C. *et al.* (1999) «The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells.», *Cancer research*, 59(24), pp. 6239-45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626818>.
60. Gosselin, D. *et al.* (2014) «Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities», *Cell*. Cell Press, 159(6), pp. 1327-1340. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.023.
61. Gruson, D. y Ko, G. (2012) «Galectins testing: New promises for the diagnosis and risk stratification of chronic diseases?», *Clinical Biochemistry*. The Canadian Society of Clinical Chemists, 45(10-11), pp. 719-726. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.04.009.
62. Hanamsagar, R., Hanke, M. L. y Kielian, T. (2012) «Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system», *Trends in Immunology*, 33(7), pp. 333-342. doi: 10.1016/j.it.2012.03.001.
63. Hanisch, U.-K. y Kettenmann, H. (2007) «Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 1387-1394. doi: 10.1038/nn1997.
64. Hayward, J. H. y Lee, S. J. (2014) «A Decade of Research on TLR2 Discovering Its Pivotal Role in Glial Activation and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases.», *Experimental neurobiology*, 23(2), pp. 138-47. doi: 10.5607/en.2014.23.2.138.
65. Hellewell, S., Semple, B. D. y Morganti-Kossmann, M. C. (2016) «Therapies negating neuroinflammation after brain trauma.», *Brain research*, 1640(Pt A), pp. 36-56. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.024.
66. Heneka, M. T. *et al.* (2001) «Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease.», *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(9), pp. 906-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556547>.
67. Heneka, M. T., Kummer, M. P. y Latz, E. (2014) «Innate immune activation in neurodegenerative disease», *Nature Reviews Immunology*, 14(7), pp. 463-477. doi: 10.1038/nri3705.
68. Hennessy, E. J., Parker, A. E. y O'Neill, L. A. J. (2010) «Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?», *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), pp. 293-307. doi: 10.1038/nrd3203.

69. Herrera, A. J. *et al.* (2005) «Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons.», *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(1), pp. 111-9. doi: 10.1007/s00702-004-0121-3.
70. Hickman, S. E. *et al.* (2013) «The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(12), pp. 1896-1905. doi: 10.1038/nn.3554.
71. Hicks, R. R. *et al.* (1997) «Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma.», *Brain research. Molecular brain research*, 48(2), pp. 401-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332737>.
72. Hicks, R. R. *et al.* (1999) «Alterations in BDNF and trkB mRNA Levels in the Cerebral Cortex Following Experimental Brain Trauma in Rats», *Journal of Neurotrauma*, 16(6), pp. 501-510. doi: 10.1089/neu.1999.16.501.
73. Holtman, I. R. *et al.* (2015) «Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis», *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1), p. 31. doi: 10.1186/s40478-015-0203-5.
74. Hughes, R. C. (1999) «Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins.», *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), pp. 172-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580137>.
75. Hyakkoku, K. *et al.* (2010) «Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia», *Neuroscience*, 171(1), pp. 258-267. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.054.
76. Jawhara, S. *et al.* (2008) «Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3.», *The Journal of infectious diseases*, 197(7), pp. 972-980. doi: 10.1086/528990.
77. Jeon, S.-B. *et al.* (2010) «Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(11), pp. 7037-46. doi: 10.4049/jimmunol.1000154.
78. Jha, M. K., Lee, W.-H. y Suk, K. (2016) «Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders.», *Biochemical pharmacology*, 103, pp. 1-16. doi: 10.1016/j.bcp.2015.11.003.
79. Jiang, H.-R. *et al.* (2009) «Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis.», *Journal of immunology*, 182, pp. 1167-1173. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.1167.
80. Jin, J.-J. *et al.* (2008) «Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.», *Journal of neuroinflammation*, 5(1), p. 23. doi: 10.1186/1742-2094-5-23.
81. Keren-Shaul, H. *et al.* (2017) «A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease.», *Cell*, 169(7), p. 1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
82. Kierdorf, K. *et al.* (2013) «Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways.», *Nature neuroscience*, 16(3), pp. 273-80. doi: 10.1038/nn.3318.
83. Kim, C. C., Nakamura, M. C. y Hsieh, C. L. (2016) «Brain trauma elicits non-canonical macrophage activation states.», *Journal of neuroinflammation*, 13(1), p. 117. doi: 10.1186/s12974-016-0581-z.
84. van Kooyk, Y. y Rabinovich, G. A. (2008) «Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses.», *Nature immunology*, 9(6), pp. 593-601. doi: 10.1038/ni.f.203.
85. Koskinen, S. y Alaranta, H. (2008) «Traumatic brain injury in Finland 1991-2005: a nationwide register study of hospitalized and fatal TBI.», *Brain injury*, 22(3), pp. 205-14. doi: 10.1080/02699050801938975.
86. Krasemann, S. *et al.* (2017) «The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases.», *Immunity*, 47(3), p. 566-581.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
87. Kreutzberg, G. W. (1996) «Microglia: a sensor for pathological events in the CNS», *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends, 19(8), pp. 312-318. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
88. Kriz, J. y Lalancette-Hébert, M. (2009) «Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia.», *Acta neuropathologica*, 117(5), pp. 497-509. doi: 10.1007/s00401-009-0496-1.
89. Kumar, A. *et al.* (2016) «Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury.», *Journal of neurotrauma*, 33(19), pp. 1732-1750. doi: 10.1089/neu.2015.4268.
90. Kumar, A. y Loane, D. J. (2012) «Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention.», *Brain, behavior, and immunity*, 26(8), pp. 1191-201. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.008.



91. Laird, M. D. *et al.* (2014) «High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4.», *Glia*, 62(1), pp. 26-38. doi: 10.1002/glia.22581.
92. Lalancette-Hébert, M. *et al.* (2007) «Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain.», *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), pp. 2596-605. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007.
93. Lalancette-Hébert, M. *et al.* (2012) «Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury.», *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(30), pp. 10383-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1498-12.2012.
94. Lambert, J.-C. *et al.* (2013) «Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease», *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 45(12), pp. 1452-1458. doi: 10.1038/ng.2802.
95. Lambertsen, K. L., Biber, K. y Finsen, B. (2012) «Inflammatory Cytokines in Experimental and Human Stroke», *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(9), pp. 1677-1698. doi: 10.1038/jcbfm.2012.88.
96. Lamkanfi, M. y Dixit, V. M. (2012) «Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease», *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), pp. 137-161. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155745.
97. Latz, E., Xiao, T. S. y Stutz, A. (2013) «Activation and regulation of the inflammasomes», *Nature Reviews Immunology*, 13(6), pp. 397-411. doi: 10.1038/nri3452.
98. Lauro, C. *et al.* (2015) «Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic molecule?», *Annals of the New York Academy of Sciences*. Wiley/Blackwell (10.1111), 1351(1), pp. 141-148. doi: 10.1111/nyas.12805.
99. Lee, C. Y. D. *et al.* (2018) «Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models», *Neuron*. Cell Press, 97(5), p. 1032-1048.e5. doi: 10.1016/j.NEURON.2018.02.002.
100. Leffler, H. *et al.* (2002) «Introduction to galectins.», *Glycoconjugate journal*, 19(7-9), pp. 433-40. doi: 10.1023/B:GLYC.0000014072.34840.04.
101. Lemaitre, B. *et al.* (1996) «The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.», *Cell*, 86(6), pp. 973-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808632>.
102. Lerman, B. J. *et al.* (2012) «Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis», *Brain and Behavior*, 2(5), pp. 563-575. doi: 10.1002/brb3.75.
103. Leyns, C. E. G. *et al.* (2017) «TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(43), pp. 11524-11529. doi: 10.1073/pnas.1710311114.
104. Li, Y. *et al.* (2008) «Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(4), pp. 2781-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684969>.
105. Liu, F.-T., Patterson, R. J. y Wang, J. L. (2002) «Intracellular functions of galectins.», *Biochimica et biophysica acta*, 1572(2-3), pp. 263-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223274>.
106. Liu, Z. *et al.* (2007) «Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia.», *Stroke*, 38(1), pp. 146-52. doi: 10.1161/01.STR.0000251791.64910.cd.
107. Lowe, J. B. (2001) «Glycosylation, immunity, and autoimmunity.», *Cell*, 104(6), pp. 809-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290318>.
108. Lu, J. *et al.* (2005) «Mortality from traumatic brain injury.», *Acta neurochirurgica. Supplement*, 95, pp. 281-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463866>.
109. MacKinnon, A. C. *et al.* (2008) «Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(4), pp. 2650-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250477>.
110. MacKinnon, A. C. *et al.* (2012) «Regulation of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-driven Lung Fibrosis by Galectin-3», *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(5), pp. 537-546. doi: 10.1164/rccm.201106-0965OC.

111. Manson, J., Thiernemann, C. y Brohi, K. (2012) «Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation.», *The British journal of surgery*, 99 Suppl 1(S1), pp. 12-20. doi: 10.1002/bjs.7717.
112. Marth, J. D. y Grewal, P. K. (2008) «Mammalian glycosylation in immunity», *Nature Reviews Immunology*, 8(11), pp. 874-887. doi: 10.1038/nri2417.
113. Massa, S. M. et al. (2010) «Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents.», *The Journal of clinical investigation*, 120(5), pp. 1774-85. doi: 10.1172/JCI41356.
114. Matcovitch-Natan, O. et al. (2016) «Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis.», *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 353(6301), p. aad8670. doi: 10.1126/science.aad8670.
115. Mathys, H. et al. (2017) «Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution.», *Cell reports*. NIH Public Access, 21(2), pp. 366-380. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.039.
116. McGeer, P. L. et al. (1988) «Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process.», *Annals of neurology*, 24(4), pp. 574-6. doi: 10.1002/ana.410240415.
117. Menon, D. K. et al. (2010) «Position statement: definition of traumatic brain injury.», *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 91(11), pp. 1637-40. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017.
118. Menon, R. P. y Hughes, R. C. (1999) «Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex.», *European journal of biochemistry*, 264(2), pp. 569-76. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491105>.
119. Monje, M. L., Toda, H. y Palmer, T. D. (2003) «Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis.», *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), pp. 1760-5. doi: 10.1126/science.1088417.
120. Morganti, J. M., Riparip, L.-K. y Rosi, S. (2016) «Call Off the Dog(ma): M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury.», *PloS one*. Editado por C. V Borlongan, 11(1), p. e0148001. doi: 10.1371/journal.pone.0148001.
121. Mosher, K. I. y Wyss-Coray, T. (2014) «Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease», *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 88(4), pp. 594-604. doi: 10.1016/J.BCP.2014.01.008.
122. Mostacada, K. et al. (2015) «Lack of galectin-3 improves the functional outcome and tissue sparing by modulating inflammatory response after a compressive spinal cord injury.», *Experimental neurology*, 271, pp. 390-400. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.07.006.
123. Mrdjen, D. et al. (2018) «High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease», *Immunity*, 48(2), p. 380-395.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.011.
124. Nagatsu, T. y Sawada, M. (2005) «Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines.», *Current pharmaceutical design*, 11(8), pp. 999-1016. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777250>.
125. Natale, J. E. et al. (2003) «Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury.», *Journal of neurotrauma*, 20(10), pp. 907-27. doi: 10.1089/089771503770195777.
126. Neher, J. J. et al. (2013) «Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), pp. E4098-107. doi: 10.1073/pnas.1308679110.
127. Nowlaczyk, A. U. y Yu, L.-G. (2011) «Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer.», *Cancer letters*, 313(2), pp. 123-8. doi: 10.1016/j.canlet.2011.09.003.
128. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. y Helmchen, F. (2005) «Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.», *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 308(5726), pp. 1314-8. doi: 10.1126/science.1110647.
129. Nomura, K. et al. (2017) «Activated Microglia Desialylate and Phagocytose Cells via Neuraminidase, Galectin-3, and Mer Tyrosine Kinase.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(12), pp. 4792-4801. doi: 10.4049/jimmunol.1502532.
130. Ohshima, S. et al. (2003) «Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis», *Arthritis & Rheumatism*, 48(10), pp. 2788-2795. doi: 10.1002/art.11287.
131. Olah, M. et al. (2018) «A transcriptomic atlas of aged human microglia.», *Nature communications*, 9(1), p. 539. doi: 10.1038/s41467-018-02926-5.

132. Pajooesh-Ganji, A. *et al.* (2012) «Characterization of inflammatory gene expression and galectin-3 function after spinal cord injury in mice.», *Brain research*, 1475, pp. 96-105. doi: 10.1016/j.brainres.2012.07.058.
133. Paolicelli, R. C. *et al.* (2011) «Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development», *Science*, 333(6048), pp. 1456-1458. doi: 10.1126/science.1202529.
134. Papaspyridonos, M. *et al.* (2008) «Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction.», *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(3), pp. 433-40. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159160.
135. Park, C. *et al.* (2008) «Toll-like receptor 2 contributes to glial cell activation and heme oxygenase-1 expression in traumatic brain injury.», *Neuroscience letters*, 431(2), pp. 123-8. doi: 10.1016/j.neulet.2007.11.057.
136. Parkhurst, C. N. *et al.* (2013) «Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor.», *Cell*, 155(7), pp. 1596-609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
137. Parpura, V. y Zorec, R. (2010) «Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes», *Brain Research Reviews*, 63(1-2), pp. 83-92. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.008.
138. Partridge, E. A. *et al.* (2004) «Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis.», *Science (New York, N.Y.)*, 306(5693), pp. 120-4. doi: 10.1126/science.1102109.
139. Pasquini, L. A. *et al.* (2011) «Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function.», *Cell death and differentiation*, 18(11), pp. 1746-56. doi: 10.1038/cdd.2011.40.
140. Pearce, N., Gallo, V. y McElvenny, D. (2015) «Head trauma in sport and neurodegenerative disease: an issue whose time has come?», *Neurobiology of aging*, 36(3), pp. 1383-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.024.
141. Peeters, W. *et al.* (2015) «Epidemiology of traumatic brain injury in Europe», *Acta Neurochirurgica*, 157(10), pp. 1683-1696. doi: 10.1007/s00701-015-2512-7.
142. Peng, Q. *et al.* (2010) «TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1.», *Science signaling*. Science Signaling, 3(122), p. ra38. doi: 10.1126/scisignal.2000500.
143. Pereira, A. R. y Menezes Falcão, L. (2015) «Galectin-3, a prognostic marker--and a therapeutic target?», *Revista portuguesa de cardiologia : orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 34(3), pp. 201-8. doi: 10.1016/j.repc.2014.10.005.
144. Perry, V. H. y Holmes, C. (2014) «Microglial priming in neurodegenerative disease», *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 10(4), pp. 217-224. doi: 10.1038/nrneurol.2014.38.
145. Pesheva, P. *et al.* (2000) «Nerve growth factor-mediated expression of galectin-3 in mouse dorsal root ganglion neurons.», *Neuroscience letters*, 293(1), pp. 37-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065132>.
146. Poliani, P. L. *et al.* (2015) «TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination», *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 125(5), pp. 2161-2170. doi: 10.1172/JCI77983.
147. Prins, C., Almeida, F. y Martinez, A. B. (2016) «Absence of galectin-3 attenuates neuroinflammation improving functional recovery after spinal cord injury», *Neural Regeneration Research*, 11(1), p. 92. doi: 10.4103/1673-5374.175051.
148. Prinz, M. *et al.* (2011) «Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration.», *Nature neuroscience*, 14(10), pp. 1227-35. doi: 10.1038/nn.2923.
149. Prinz, M. y Mildner, A. (2011) «Microglia in the CNS: immigrants from another world.», *Glia*, 59(2), pp. 177-87. doi: 10.1002/glia.21104.
150. Prinz, M. y Priller, J. (2014) «Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease.», *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), pp. 300-12. doi: 10.1038/nrn3722.
151. Rabinovich, G. A. *et al.* (2007) «An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer.», *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), pp. 143-58. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01986.x.
152. Rabinovich, G. A. *et al.* (2007) «Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices», *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Current Trends, 17(5), pp. 513-520. doi: 10.1016/J.SBI.2007.09.002.

153. Rabinovich, G. A. y Toscano, M. A. (2009) «Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation.», *Nature reviews. Immunology*, 9(5), pp. 338-52. doi: 10.1038/nri2536.
154. Radosavljevic, G. *et al.* (2012) «The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression.», *Immunologic research*, 52(1-2), pp. 100-10. doi: 10.1007/s12026-012-8286-6.
155. Rahimian, R., Béland, L.-C. y Kriz, J. (2018) «Galectin-3: mediator of microglia responses in injured brain», *Drug Discovery Today*, 23(2), pp. 375-381. doi: 10.1016/j.drudis.2017.11.004.
156. Ransohoff, R. M. y Brown, M. A. (2012) «Innate immunity in the central nervous system.», *The Journal of clinical investigation*, 122(4), pp. 1164-71. doi: 10.1172/JCI58644.
157. Ransohoff, R. M. y Cardona, A. E. (2010) «The myeloid cells of the central nervous system parenchyma», *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7321), pp. 253-262. doi: 10.1038/nature09615.
158. Ransohoff, R. M. y Perry, V. H. (2009) «Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.», *Annual review of immunology*, 27(1), pp. 119-45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
159. Reynolds, W. F. *et al.* (1999) «Myeloperoxidase Polymorphism Is Associated with Gender Specific Risk for Alzheimer’s Disease», *Experimental Neurology*, 155(1), pp. 31-41. doi: 10.1006/exnr.1998.6977.
160. Rigato, C. *et al.* (2011) «Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks.», *Glia*, 59(4), pp. 675-95. doi: 10.1002/glia.21140.
161. Rodrigues, R. J., Tomé, A. R. y Cunha, R. A. (2015) «ATP as a multi-target danger signal in the brain.», *Frontiers in neuroscience*, 9, p. 148. doi: 10.3389/fnins.2015.00148.
162. Rotshenker, S. (2009) «The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease.», *Journal of molecular neuroscience : MN*, 39(1-2), pp. 99-103. doi: 10.1007/s12031-009-9186-7.
163. Safaiyan, S. *et al.* (2016) «Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging.», *Nature neuroscience*, 19(8), pp. 995-8. doi: 10.1038/nn.4325.
164. Saijo, K. y Glass, C. K. (2011) «Microglial cell origin and phenotypes in health and disease», *Nature Reviews Immunology*, 11(11), pp. 775-787. doi: 10.1038/nri3086.
165. Saito, A. *et al.* (2004) «Oxidative stress affects the integrin-linked kinase signaling pathway after transient focal cerebral ischemia.», *Stroke*, 35(11), pp. 2560-5. doi: 10.1161/01.STR.0000144653.32853.ed.
166. Sato, S. *et al.* (2009) «Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble  $\beta$ -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)», *Immunological Reviews*. Wiley/Blackwell (10.1111), 230(1), pp. 172-187. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00790.x.
167. Sato, S. y Hughes, R. C. (1994) «Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages.», *The Journal of biological chemistry*, 269(6), pp. 4424-30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8308013>.
168. Satoh, K., Niwa, M., Goda, W., *et al.* (2011) «Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia.», *Brain research*, 1382, pp. 266-74. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.049.
169. Satoh, K., Niwa, M., Binh, N. H., *et al.* (2011) «Increase of galectin-3 expression in microglia by hyperthermia in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia.», *Neuroscience letters*, 504(3), pp. 199-203. doi: 10.1016/j.neulet.2011.09.015.
170. Schafer, D. P. *et al.* (2012) «Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner.», *Neuron*, 74(4), pp. 691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
171. Schulz, C. *et al.* (2012) «A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells», *Science*, 336(6077), pp. 86-90. doi: 10.1126/science.1219179.
172. Shan, R. *et al.* (2016) «A New Panel of Blood Biomarkers for the Diagnosis of Mild Traumatic Brain Injury/Concussion in Adults.», *Journal of neurotrauma*, 33(1), pp. 49-57. doi: 10.1089/neu.2014.3811.
173. Shen, Y.-F. *et al.* (2016) «The change of plasma galectin-3 concentrations after traumatic brain injury.», *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 456, pp. 75-80. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.029.
174. Shimohama, S. *et al.* (2000) «Activation of NADPH oxidase in Alzheimer’s disease brains.», *Biochemical and biophysical research communications*, 273(1), pp. 5-9. doi: 10.1006/bbrc.2000.2897.
175. Shin, T. (2013) «The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review.», *Acta histochemica*, 115(5), pp. 407-11. doi: 10.1016/j.acthis.2012.11.010.

176. Simovic Markovic, B. *et al.* (2016) «Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 $\beta$  in Macrophages», *Journal of Crohn's and Colitis*, p. jjw013. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw013.
177. Sirko, S. *et al.* (2015) «Astrocyte reactivity after brain injury-: The role of galectins 1 and 3.», *Glia*, 63(12), pp. 2340-61. doi: 10.1002/glia.22898.
178. Sohrabji, F. y Williams, M. (2013) «Stroke neuroprotection: oestrogen and insulin-like growth factor-1 interactions and the role of microglia.», *Journal of neuroendocrinology*, 25(11), pp. 1173-81. doi: 10.1111/jne.12059.
179. Stancic, M. *et al.* (2011) «Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions.», *Neuropathology and applied neurobiology*, 37(6), pp. 654-671. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01184.x.
180. Stewart, C. R. *et al.* (2010) «CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer.», *Nature immunology*, 11(2), pp. 155-61. doi: 10.1038/ni.1836.
181. Stillman, B. N. *et al.* (2006) «Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(2), pp. 778-89. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639396>.
182. Suarez, G. y Meyerrose, G. (2014) «Heart failure and galectin 3.», *Annals of translational medicine*, 2(9), p. 86. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.10.
183. Sundblad, V., Croci, D. O. y Rabinovich, G. A. (2011) «Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues.», *Histology and histopathology*, 26(2), pp. 247-65. doi: 10.14670/HH-26.247.
184. Suzuki, Y. *et al.* (2012) «Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia.», *Scientific reports*, 2(1), p. 896. doi: 10.1038/srep00896.
185. Tagliaferri, F. *et al.* (2006) «A systematic review of brain injury epidemiology in Europe.», *Acta neurochirurgica*, 148(3), p. 255-68; discussion 268. doi: 10.1007/s00701-005-0651-y.
186. Taylor, S. E. *et al.* (2014) «Rod Microglia: A Morphological Definition», *PLoS ONE*. Editado por J. El Khoury, 9(5), p. e97096. doi: 10.1371/journal.pone.0097096.
187. Thaney, V. E. *et al.* (2017) «IFN $\beta$  Protects Neurons from Damage in a Murine Model of HIV-1 Associated Brain Injury», *Scientific Reports*, 7, p. 46514. doi: 10.1038/srep46514.
188. Théry, C. *et al.* (2001) «Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.», *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), pp. 7309-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390481>.
189. Toscano, M. A. *et al.* (2007) «Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: Glycan-binding proteins with cytokine-like activity?», *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Pergamon, 18(1-2), pp. 57-71. doi: 10.1016/J.CYTOGFR.2007.01.006.
190. Tremblay, M.-È., Lowery, R. L. y Majewska, A. K. (2010) «Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience.», *PLoS biology*. Editado por M. Dalva, 8(11), p. e1000527. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.
191. Udan, M. L. D. *et al.* (2008) «Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line.», *Journal of neurochemistry*, 104(2), pp. 524-33. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05001.x.
192. Ulland, T. K. *et al.* (2017) «TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease.», *Cell*, 170(4), p. 649-663.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.023.
193. Vasil'eva, O. A. *et al.* (2013) «[Regulation of the genes expression of CD4+ T-lymphocytes differentiation transcription factors by galectin-3 in vitro].», *Molekuliarnaia biologiya*, 47(6), pp. 1004-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25509862>.
194. Venkatesan, C. *et al.* (2010) «Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury.», *Journal of neuroinflammation*, 7(1), p. 32. doi: 10.1186/1742-2094-7-32.
195. Vodovotz, Y. *et al.* (1996) «Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease.», *The Journal of experimental medicine*, 184(4), pp. 1425-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879214>.
196. Vukovic, J. *et al.* (2012) «Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging.», *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(19), pp. 6435-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5925-11.2012.

197. Wake, H. *et al.* (2009) «Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals.», *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(13), pp. 3974-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009.
198. Wang, Y. *et al.* (2015) «TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model.», *Cell*. Elsevier, 160(6), pp. 1061-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
199. Wesley, U. V *et al.* (2013) «Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling.», *Brain research*, 1496, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.008.
200. Wu, C.-H. *et al.* (2014) «Post-injury treatment with 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, protects against experimental traumatic brain injury via PI3K/Akt signaling.», *PloS one*. Editado por M. Ohno, 9(11), p. e113397. doi: 10.1371/journal.pone.0113397.
201. Yan, Y.-P. *et al.* (2009) «Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling.», *Brain research*, 1288, pp. 116-24. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.073.
202. Yang, R.-Y., Rabinovich, G. a y Liu, F.-T. (2008) «Galectins: structure, function and therapeutic potential.», *Expert reviews in molecular medicine*, 10(July 2015), p. e17. doi: 10.1017/S1462399408000719.
203. Yang, R. Y., Hsu, D. K. y Liu, F. T. (1996) «Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp. 6737-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692888>.
204. Yoo, H.-I. *et al.* (2017) «Neuroanatomical distribution of galectin-3 in the adult rat brain», *Journal of Molecular Histology*, 48(2), pp. 133-146. doi: 10.1007/s10735-017-9712-9.
205. Yoshii, T. *et al.* (2002) «Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest.», *The Journal of biological chemistry*, 277(9), pp. 6852-7. doi: 10.1074/jbc.M107668200.
206. Yu, Z.-Q. y Zha, J.-H. (2012) «Genetic ablation of toll-like receptor 2 reduces secondary brain injury caused by cortical contusion in mice.», *Annals of clinical and laboratory science*, 42(1), pp. 26-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371907>.
207. Zhang, D. *et al.* (2014) «TLR4 inhibitor resatorvid provides neuroprotection in experimental traumatic brain injury: implication in the treatment of human brain injury.», *Neurochemistry international*, 75, pp. 11-8. doi: 10.1016/j.neuint.2014.05.003.
208. Zhang, Z. G. y Chopp, M. (2016) «Exosomes in stroke pathogenesis and therapy», *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), pp. 1190-1197. doi: 10.1172/JCI81133.
209. Ziebell, J. M. *et al.* (2012) «Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury.», *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p. 247. doi: 10.1186/1742-2094-9-247.
210. Zuberi, R. I. *et al.* (2004) «Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma.», *The American journal of pathology*, 165(6), pp. 2045-53. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63255-5.